

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

**Prüferinitiierte placebokontrollierte randomisierte Pilotstudie  
zum Einfluß von Fluticason und Salmeterol auf plasmazytoide  
Dendritische Zellen (pDC) von Rauchern mit COPD im  
Stadium 0 oder 1 nach GOLD**

Eine klinisch – experimentelle Studie

---

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor medicinae**

**(Dr. med.)**

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

**Universität  
Rostock**



Traditio et Innovatio

vorgelegt von

Ulrike Schlüter, geb. Kraeft

Rostock, Juni 2015

**Gutachter:**

1. Gutachter:  
Prof. Dr. Uwe R. Juergens  
Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Bonn
2. Gutachter:  
Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz  
Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universitätsmedizin  
Rostock
3. Gutachter:  
Prof. Dr. Marek Lommatzsch  
Abteilung für Pneumologie, Universitätsmedizin Rostock

**Datum der Einreichung:** 26. Juni 2015

**Datum der Verteidigung:** 16. Februar 2016

Meiner Familie  
gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Angeborenes und Erworbenes Immunsystem .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Angeborenes Immunsystem .....	6
1.1.2 Adaptives Immunsystem.....	7
<b>1.2 Abwehrmechanismen der Lunge .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Dendritische Zellen in der Lunge.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Subpopulationen von DC.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Die Rolle von pDC in der Infektabwehr.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Zigarettenrauch-assoziierte Lungenerkrankungen .....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Infektneigung unter Steroidtherapie.....</b>	<b>14</b>
<b>1.8 Fazit und Fragestellungen .....</b>	<b>15</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Probanden.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Ablauf der Studie.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Studienmedikation .....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Fluticason (F, Flutide® 250 µg Discus) .....	25
2.3.2 Fluticason+Salmeterol (F+S, Viani® 50 µg / 250 µg Discus) .....	26
2.3.3 Placebo (P) .....	26
<b>2.4 Randomisierung, Verblindung und Entblindung .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Bodyplethysmographie.....</b>	<b>27</b>
2.5.1 Material .....	27
2.5.2 Methode .....	27
2.5.3 Durchführung .....	29
<b>2.6 Körperliche Untersuchung .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Anlage eines peripheren Venenzuganges mit Blutentnahme .....</b>	<b>32</b>
2.7.1 Material .....	32
2.7.2 Methode und Durchführung .....	32
2.7.3 Blutwertmessungen .....	33
<b>2.8 Pulsoxymetrie.....</b>	<b>33</b>
<b>2.9 Flexible Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) .....</b>	<b>34</b>
2.9.1 Material .....	34
2.9.2 Methode und Durchführung .....	34
<b>2.10 Aufbereitung der BALF inklusive Zellzählung .....</b>	<b>36</b>
2.10.1 Material .....	36
2.10.2 Methode und Durchführung .....	37

<b>2.11 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)</b> .....	<b>38</b>
2.11.1 Material .....	38
2.11.2 Methode.....	39
2.11.3 Durchführung .....	41
2.11.4 Analyse der Zellen .....	42
<b>2.12 Statistische Auswertung</b> .....	<b>43</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
3.1 Charakterisierung der Studienpopulation.....	44
3.2 Charakterisierung der Lungenfunktion .....	48
3.3 Leukozytendifferenzierung in der BALF.....	49
3.4 Blut-Parameter.....	53
3.5 Anzahl der pDC in der BALF und im Blut.....	56
3.6 Oberflächenmarker auf den pDC .....	60
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1 Methodische Stärken und Schwächen .....	61
4.1.1 Stärken der Arbeit.....	61
4.1.2 Schwächen der Arbeit.....	61
4.2 Gesamtleukozyten in BALF und Blut.....	62
4.3 Einfluss der ICS auf die pDC in den Atemwegen .....	63
4.4 Rolle der ICS in der COPD-Therapie.....	64
4.5 Schlussfolgerung .....	68
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>69</b>
<b>6. Anhang</b> .....	<b>70</b>
6.1 Literaturverzeichnis .....	70
6.2 Abkürzungsverzeichnis .....	77
6.3 Abbildungsverzeichnis .....	79
6.4 Tabellenverzeichnis .....	81
6.5 Prüfplan der Studie .....	81
6.6 Patienteninformationen und Einwilligungen.....	81
6.7 Untersuchungsunterlagen.....	81
6.8 Weitere Daten .....	82
6.9 Curriculum Vitae.....	82
6.10 Publikation .....	82
6.11 Danksagung.....	83
6.12 Thesen zur Dissertationsschrift.....	84
6.13 Eidesstattliche Erklärung .....	85

# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborenes und Erworbenes Immunsystem

Das Immunsystem kann man in zwei unterschiedlich funktionierende Systeme gliedern. Es gibt ein angeborenes System mit unspezifisch wirkenden Zellen und Stoffen, welches die erste, frühe Phase der Abwehr von Krankheitserregern dominiert, und ein adaptives, selektiv wirksames System, welches bei der antigen-spezifischen Immunantwort eine tragende Rolle spielt. Beide Systeme dieser Immunantwort sind miteinander vernetzt (Abb. 1).

### 1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Die angeborene Immunantwort wird durch viele mechanische (mukoziliärer Apparat), chemische (Lysozym, Defensine), und physikalische (intakte Epithelschicht) Abwehrmechanismen unterstützt <sup>1</sup>. Die wichtigsten Zellen, die an diesen Prozessen des angeborenen Immunsystems beteiligt sind, sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (natural killer cells – NK cells).

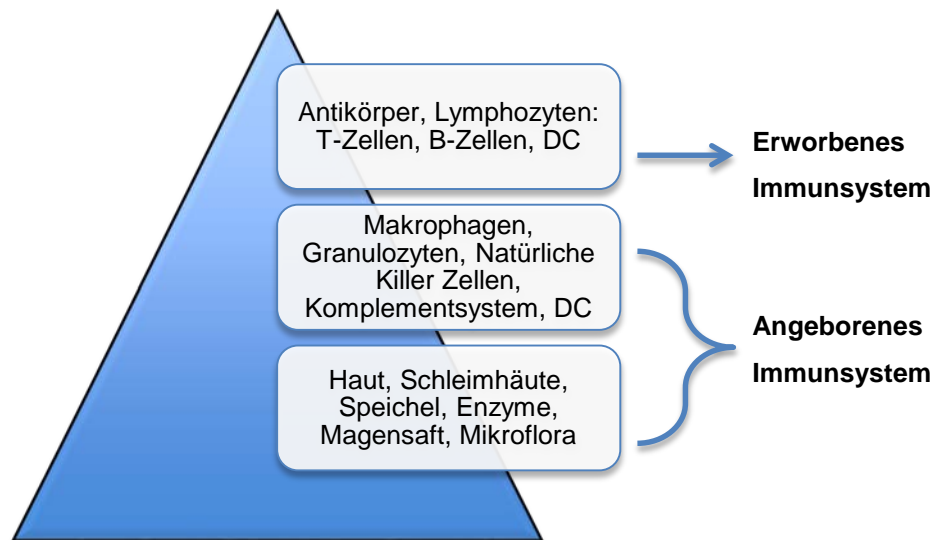
Makrophagen sind vermehrt in lymphoretikulären Organen anzutreffen und machen verschiedene Subpopulationen in Organen, wie z.B. der Lunge, aus. Sie sind darauf spezialisiert, Krankheitserreger zu identifizieren, phagozytieren und die Wiederherstellung des Gewebes nach erfolgreicher Beseitigung („Clearance“) von Erregern zu fördern <sup>2</sup>. Prinzipiell ist eine quantitativ und qualitativ adäquate Makrophagenpopulation zur Krankheitsbekämpfung wichtig <sup>3</sup>.

Neutrophile Granulozyten sind im Blut die häufigsten Leukozyten, die im peripheren Gewebe normalerweise nicht vorkommen und für die Ausschüttung zahlreicher toxischer Substanzen nach der Migration zum Ort des entzündlichen Prozesses verantwortlich sind. Diese ähneln den Makrophagen, sie reagieren auch auf Signale, die vom Gewebe und Immunsystem stammen. Weiterhin interagieren sie in bidirektionalen Interaktionen mit verschiedenen Komponenten des angeborenen und

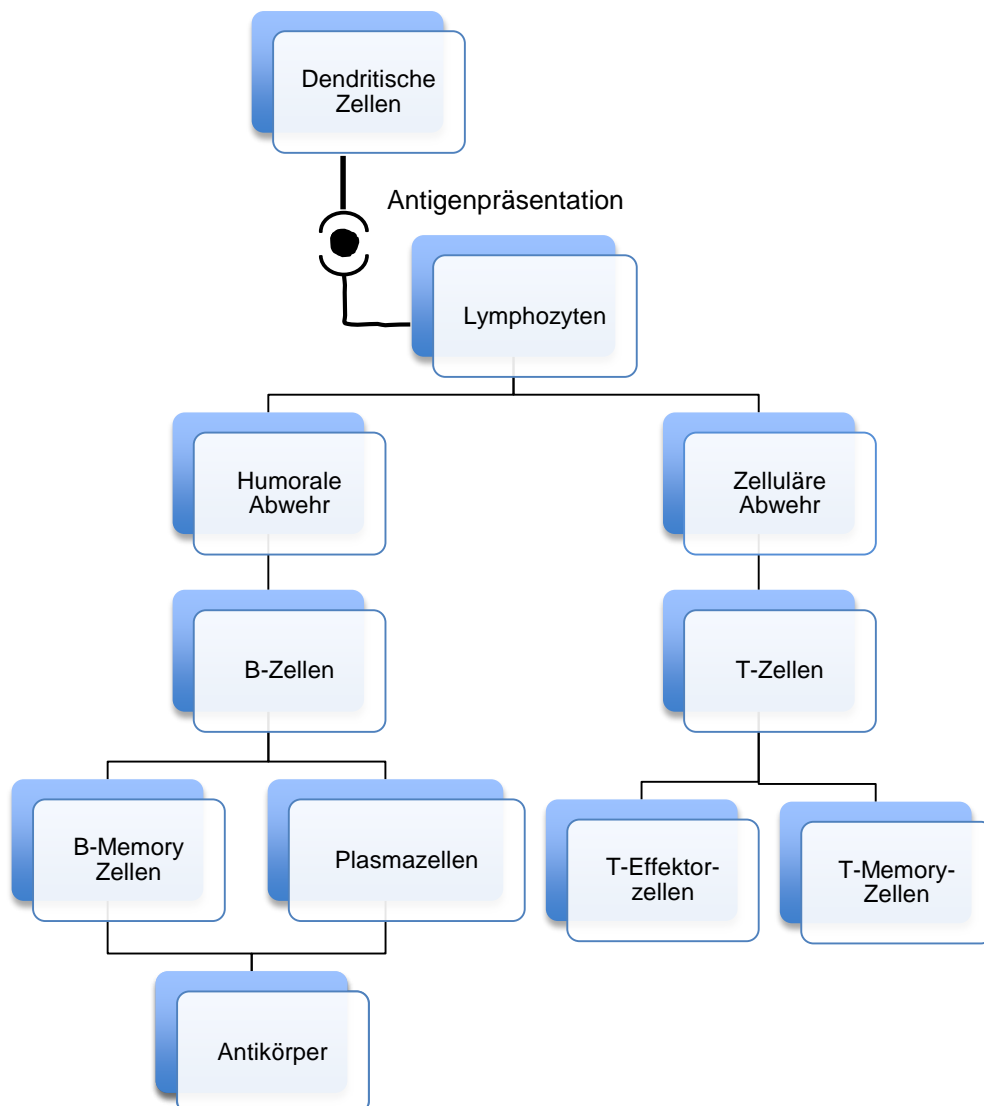
adaptiven Immunsystems <sup>4</sup>. Abgesehen von den reaktiven Sauerstoffmolekülen und NO sind auch Komplementfaktoren, Myeloperoxidase und proteolytische Enzyme wie Granulozyten-Elastase und toxische Granulabestandteile Effektormoleküle der unspezifischen Immunantwort. Dendritische Zellen (DC), die zentralen Zellen des adaptiven Immunsystems, spielen auch eine Rolle im angeborenen Immunsystem <sup>5</sup>. Durch die Exposition von Toll-like Rezeptoren (TLR) erkennen sie PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) und spielen dadurch eine wichtige Rolle in der Infektabwehr.

### **1.1.2 Adaptives Immunsystem**

Eine Antigenexposition führt neben der unselektiven Abwehr auch zu einer adaptiven Immunantwort, die spezifisch und nachhaltig gegen einzelne Krankheitserreger gerichtet ist (Abb. 2). Diese Antwort auf Fremdstrukturen ist individualisierter, wirkungsvoller und andauernder. Sie erfolgt in mehreren Schritten <sup>6</sup>. Die zentrale Schaltstelle des adaptiven Immunsystems und wichtigste Antigen-präsentierende Zelle (APC) ist die DC. Diese steuert durch die Art der Antigenpräsentation durch die Expression von Co-stimulatorischer Moleküle, die Sekretion von Botenstoffen, die Aktivierung und Proliferation spezifischer T- und B-Lymphozyten, die Bildung humoraler Abwehrstoffe und die Bildung von Memory- (Gedächtnis-) Zellen. T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunität und B-Zellen für die Antikörper-Produktion als Basis der humoralen Immunität verantwortlich. Diese spezifischen Abwehrmechanismen sorgen für eine gezielte und nachhaltige Elimination der erkannten Antigene.



**Abb. 1** Das angeborene und erworbene Immunsystem im Überblick.



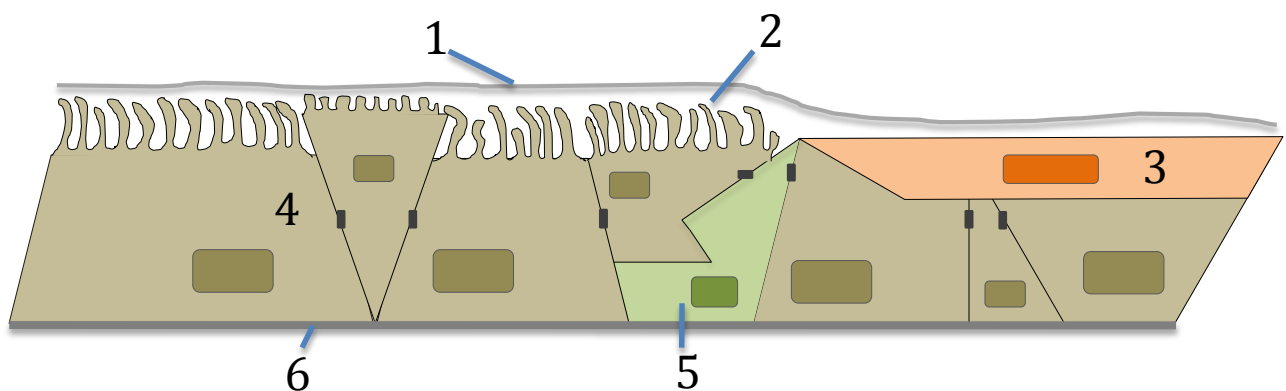
**Abb. 2** Das erworbene Immunsystem im Detail.



## 1.2 Abwehrmechanismen der Lunge

Die Lunge verfügt über verschiedene Abwehrmechanismen, da die Schleimhautoberfläche ständig verschiedenen Antigenen, wie z.B. Bestandteilen des Tabakrauches, aus der Umgebungsluft ausgesetzt ist. Daher gibt es im respiratorischen System eine Reihe struktureller und funktioneller Barrieren, die den Körper vor gefährlichen und anderen Partikeln schützt <sup>7</sup>.

Zur angeborenen Immunabwehr zählen der Surfactant-Film und eine wässrige Schicht, die mit viskoser Flüssigkeit benetzt ist und den mukoziliären Apparat beinhaltet <sup>8, 9</sup>. Makrophagen tragen als professionelle Phagozyten zum Schutz vor Partikeln, Erregern oder verschiedenem schädlichem Material bei. Sie befinden sich in den Atemwegen und auch in den Alveolen <sup>10</sup>. Andere bedeutsame Barrieren sind die Epithelschicht mit Tight Junctions zwischen den Zellen, DC als professionelle APC und die Basalmembran (Abb. 3) <sup>11, 12</sup>. 95% der eingeatmeten Antigene werden aus den Atemwegen durch aerodynamische Mechanismen (e.g. Husten-Clearance) und die mukoziliäre Clearance entfernt. Daher nimmt die Menge an Antigenen in den peripheren Atemwegen ab <sup>13</sup>. Für eine ausreichende mukoziliäre Clearance sind die Anzahl und Struktur der Zilien, ausreichend Wärme und Feuchtigkeit und koordinierte Bewegungsabläufe von Bedeutung <sup>14</sup>.



**Abb. 3** Abwehrstrukturen in der Lunge.

Schematische Abbildung der einzelnen Abwehrstrukturen der Lunge. 1: Surfactant-Film, 2: wässrige Schicht mit mukoziliärem Apparat, 3: Makrophage, 4: Epithelzelle mit Tight-junctions, 5: Dendritische Zelle, 6: Basallamina. Adaptiert nach <sup>15</sup>.

Auf der zellulären Ebene stellen dendritische Zellen die wichtigsten und potentesten APC in der Lunge dar. Sie sind wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und zentraler Ausgangspunkt der adaptiven Immunantwort.

Toxische Bestandteile des Zigarettenrauchs sind in der Lage, neben anderen schädlichen Stoffen, diese angeborenen und erworbenen Abwehrsysteme zu beeinflussen und pathologische Prozesse auszulösen<sup>16</sup>. Daher soll die Verteilung der DC in der Lunge beleuchtet werden, um dann auf die genaue Charakterisierung der DC in Verbindung mit deren Reaktion auf Zigarettenrauch einzugehen.

### 1.3 Dendritische Zellen in der Lunge

In der Lunge bilden dendritische Zellen ein gut entwickeltes und kompaktes Netzwerk. Sie befinden sich hauptsächlich subepithelial und in den basalen Epithelschichten und können das Lumen der Atemwege dennoch erreichen (Abb. 3). Im Lungenparenchym sind DC besonders in den Alveolarsepten auffindbar<sup>17</sup>. In den großen Atemwegen beträgt ihre Zahl mehrere Hundert Zellen pro mm<sup>2</sup> und weniger als 100 Zellen pro mm<sup>2</sup> in den kleinen Atemwegen<sup>18</sup>. DC scheinen sich meistens im unreiferen Zustand zu befinden, mit niedriger Expression co-stimulatorischer Marker (CD80 und CD86), jedoch in erhöhter Bereitschaft, Antigene zu identifizieren und aufzunehmen<sup>19</sup> (Abb. 4). Im gesunden Zustand findet ein dauerhafter Einstrom unreifer DC in die Lunge und ein Abstrom reifer DC in die mediastinalen Lymphknoten statt<sup>20</sup>.

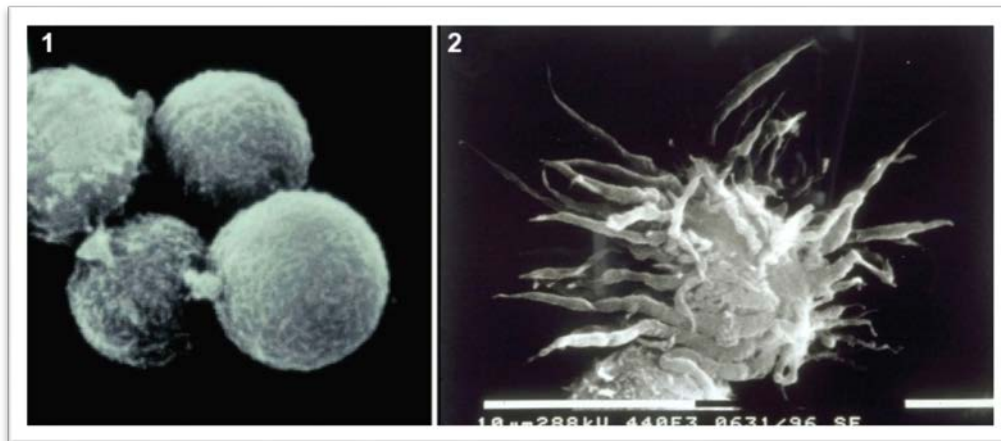
DC können histologisch in der humanen Lunge dargestellt werden<sup>21, 22, 23</sup>. Bei diesen Studien ergab sich jedoch das methodologische Problem, dass nur ein oder zwei Marker gleichzeitig histologisch gefärbt werden können. Da es bisher jedoch keinen singulären Marker für DC gibt (es gibt nur Marker für DC-Subpopulationen, wie z.B. Langerhanszellen), können DC histologisch nicht differenziert werden. Mit der Möglichkeit der Mehrfachfärbung bietet die Durchflusszytometrie eine Alternative, da durch die Mehrfachfärbung die DC von den anderen Immunzellen präzise abgegrenzt werden können, und zusätzlich bezüglich der Expression bestimmter funktionsassoziierter Moleküle charakterisiert werden können.

Bei der Aufbereitung von Lungenparenchym zur DC-Durchflusszytometrie kommt es aber zu Artefakten durch die Aufreinigung, die die Aussagekraft erneut einschränken. Bei dieser Methodik, mit ausgedehnten Isolations- und Reinigungsschritten, mit enzymatischer Aufarbeitung, nachfolgender Zentrifugation und längeren Inkubationszeiten, werden ausgeprägte phänotypische und funktionelle Veränderungen der DC induziert <sup>24</sup>.

Es befinden sich endoluminal in den Atemwegen deutlich weniger DC als im Lungenparenchym und somit auch wenige DC in der humanen bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF). Aus dieser Sicht ist die BALF nicht das optimale Material zur Untersuchung und Charakterisierung von DC in der Lunge. Andererseits kann aber aus der BALF ohne ausgedehnte Aufbereitung eine Untersuchung nativer DC erfolgen. Dies eröffnet die einzigartige Möglichkeit, native humane Lungen-DC und deren Subpopulationen detailliert durchflußzytometrisch zu charakterisieren <sup>25</sup>.

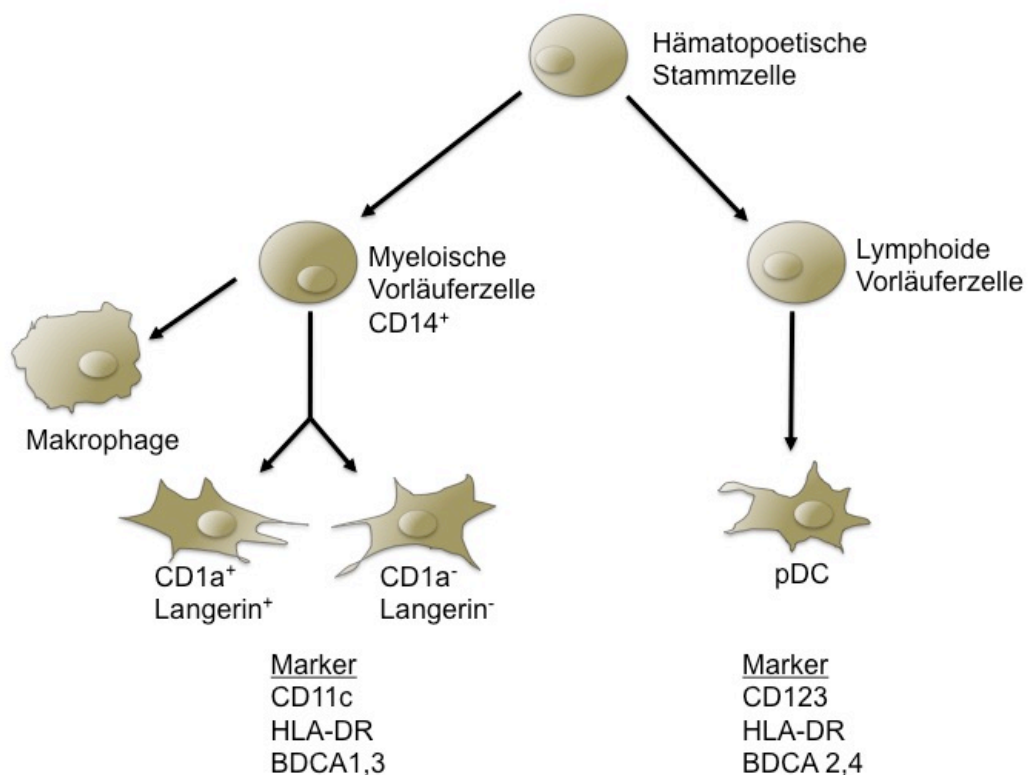
## **1.4 Subpopulationen von DC**

Bei den DC gibt es zwei bedeutenden Subpopulationen: zum einen die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) (Abb. 4), die sich aus lymphozytären Vorläuferzellen entwickeln und zum anderen die myeloiden DC (mDC), die von monozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen <sup>26</sup>. Bis heute ist kein singulärer Marker bekannt, der pDC oder mDC eindeutig identifiziert. Vielmehr sind pDC durch die Konstellation bestimmter Oberflächenmarker definiert. PDC werden anhand der Expression von HLA-DR und CD123 und der fehlenden Expression von sogenannten "Lineage Markern" (Marker anderer Immunzellen) identifiziert <sup>25</sup>.



**Abb. 4 Links (1) ruhende und rechts (2) aktivierte pDC.** Entnommen aus <sup>27</sup>.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Regulation der plasmazytoiden DC (pDC) in humanen Atemwegen. PDC entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen über lymphoide Vorläuferzellen zu Zellen mit Plasmazellen-ähnlicher Morphologie und reichlich endoplasmatischem Retikulum (Abb. 5) <sup>28, 29</sup>.



**Abb. 5 Entwicklung von dendritischen Zellen,** adaptiert nach <sup>29</sup>.

## 1.5 Die Rolle von pDC in der Infektabwehr

Plasmazytoide dendritische Zellen spielen eine integrale Rolle bei der Immunabwehr und fungieren im weitesten Sinne als ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität<sup>30</sup>. Sie können im Rahmen der angeborenen Immunantwort eine große Menge an Typ-I-Interferon (IFN-1) produzieren und damit eine Kaskade an antiviralen Maßnahmen in dem infizierten Wirt auslösen<sup>31</sup>. Typ-I-Interferon aktiviert und modifiziert bestimmte Signalwege, die Nachbarzellen vor der Infektgefahr warnen oder in virus-infizierte Zellen Apoptose induzieren<sup>32</sup>.

PDC können zusätzlich im Rahmen der adaptiven Immunantwort Zytokine wie INF- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12 produzieren<sup>33</sup> und damit Einfluss auf die Polarisierung der T-Zell- und B-Zell-Antwort haben<sup>34, 35, 36</sup>.

Dreschler et al. zeigten, dass die pDC im peripheren Blut und deren TLR-9 Expression mit zunehmenden Alter abnehmen. Dies könnte darauf hinweisen, dass sowohl die antivirale Aktivität als auch die Immuninduktion durch pDC im Alter abnehmen<sup>37</sup>. In einer *in vitro* Studie wurde gezeigt, dass pDC auch durch Zigarettenrauchextrakt auf molekularer Ebene verändert werden<sup>38</sup>.

## 1.6 Zigarettenrauch-assoziierte Lungenerkrankungen

Tabakrauchen spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Lungenerkrankungen<sup>39, 40</sup>. Die rauch-assoziierten Krankheiten lassen sich in zwei Untereinheiten gruppieren: Durch Rauchen ausgelöste Erkrankungen und durch Rauchen aggravierte Erkrankungen (Tab. 1). Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), die zurzeit weltweit die fünfthäufigste Todesursache mit steigender Tendenz darstellt, wird vor allem durch Rauchen ausgelöst. Es wird angenommen, dass die COPD 2030 die vierthäufigste zum Tode führende Krankheit sein wird<sup>41</sup>. Metaanalysen zeigten eine Prävalenz, die bei Erwachsenen 10%-14% beträgt und im höheren Alter und abhängig vom Zigarettenkonsum stark zunimmt<sup>42, 43</sup>.

Durch Rauchen ausgelöste Erkrankungen	Durch Rauchen aggravierte Erkrankungen
COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) Chronische Bronchitis Karzinome der Atemwege PLCH (Pulmonale Langerhanszell-Histiozytose) DIP (Desquamöse Interstitielle Pneumonie) RBILD (Respiratorische Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung)	Asthma bronchiale $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel Infekte der Atemwege Tuberkulose Idiopathische Lungenfibrose Pneumokoniosen Eosinophile Pneumonie

**Tab. 1** Rauch-assoziierte Lungenerkrankungen (Beispiele).

Es wurde gezeigt, dass Zigarettenrauchen sich auch bei Asthma bronchiale (bis zu 40% der Patienten mit Asthma in Europa rauchen <sup>44</sup>) ungünstig auf den Krankheitsverlauf auswirkt. Auch Passivexposition gegenüber Zigarettenrauch ist vor allem für Kinder gefährlich, denn es kann zu Einschränkungen der Lungenfunktion, vermehrten Atemwegsinfekten und zu einem erhöhtem Risiko, an Asthma zu erkranken, führen <sup>45</sup>. Insbesondere in Familien, in denen beide Elternteile rauchen, ist Passivrauchen bei Kindern und Jugendlichen oft mit Asthma-ähnlichen Beschwerden verknüpft <sup>46</sup>.

Aktives Zigarettenrauchen ist mit einem größeren Risiko, an Pneumonien, insbesondere Influenzapneumonien, zu erkranken verbunden <sup>47</sup>. Aber auch bei der Pneumokokkeninfektion, der Legionellenpneumonie und der Lungentuberkulose spielt Rauchen als Risikofaktor eine bedeutende Rolle <sup>48, 49</sup>. Es fand sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten und dem Risiko, an Lungentuberkulose oder an einer Pneumokokkeninfektion zu erkranken <sup>50, 48</sup>.

## 1.7 Infektneigung unter Steroidtherapie

Es wurde in vielen Studien belegt, dass eine Therapie mit inhalativen Steroiden (ICS) von Patienten mit COPD mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, eine Pneumonie zu entwickeln, assoziiert ist <sup>51, 52, 53, 54, 55</sup>. Eine Fall-Kontroll-Studie von 2007 fand außerdem ein erhöhtes Risiko von Pneumonien bei Patienten, die kurz zuvor höhere Dosen Corticosteroide eingenommen hatten <sup>56</sup>.

Brusselle postuliert, dass dieses erhöhte Risiko teilweise auf die steroid-induzierte Unterdrückung der adaptiven Immunantwort und auf die Unterdrückung der pulmonalen B-Zell-Follikelformation und -funktion zurückzuführen ist <sup>57</sup>. Weiterhin wird postuliert, dass hierbei zusätzlich das angeborene Immunsystem in der Lungenschleimhaut beeinträchtigt wird <sup>58</sup>. Die spezifische Bedeutung der pDC in diesem Zusammenhang ist jedoch nicht bekannt.

Lommatzsch et al. zeigte, dass in der BALF von Patienten mit einer Pneumonie die Anzahl von pDC erhöht waren. Im Gegensatz dazu fehlte dieser Anstieg bei immunsupprimierten Patienten mit Pneumonie. Dieses weist darauf hin, dass pDC bei der Immunreaktion gegen Pneumonien eine Rolle spielen. Weiterhin konnte spekuliert werden, dass eine reduzierte Kapazität von pDC, in den Atemwege zu akkumulieren, zu einer erhöhten Neigung zu Atemwegsinfekten bei immunkompromittierten Patienten beitragen könnte <sup>59</sup>.

## 1.8 Fazit und Fragestellungen

pDC spielen eine zentrale Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Im Rahmen der Infektabwehr spielen sie eine besondere Rolle bei der Abwehr von Viren. Inhalative Steroide (ICS) werden bei Zigarettenrauch-assoziierten Erkrankungen wie der COPD eingesetzt. Der Einfluss der ICS auf pDC in den humanen Atemwegen ist jedoch unbekannt.

Demzufolge ist es wichtig aufzudecken, welchen Effekt inhalative Steroide, entweder als alleinige Gabe oder in Kombination mit langwirksamen Beta-2-Mimetika (LABA), auf die pDC in den humanen Atemwegen *in vivo* haben. Durch Bratke und Lommatzsch wurde eine neue Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung von pDC in der BALF vom Menschen entwickelt <sup>25, 59</sup>. Diese Methode ist in der Lage, die Anzahl und die Charakteristika von pDC in den Atemwegen von Rauchern umfangreich zu beschreiben.

Folgende konkrete Fragen sollen durch die vorliegende Promotionsarbeit beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Anzahl der pDC in der BALF unter Rauchern, die mit einem inhalierten Steroid (Fluticason), einer Kombination aus einem inhalierten Steroid und einem LABA (Fluticason+Salmeterol) oder Placebo behandelt wurden?
2. Sind die auf den pDC der BALF exprimierten Oberflächenmarker bei den Rauchern in den verschiedenen Studienarmen verändert?

Hierzu wurde eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie durchgeführt, deren Design, Durchführung und Ergebnisse in der vorliegenden Dissertationsschrift dargelegt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probanden

Potentielle Probanden wurden durch öffentliche Aushänge in Rostock sowie zwei Zeitungsanzeigen im „Warnow-Kurier“ Rostock im Zeitraum von September 2008 bis Juli 2009 auf die klinische Studie der Abteilung für Pneumologie an der Universität Rostock aufmerksam gemacht. Interessenten meldeten sich telefonisch oder per E-Mail. Telefonisch erfolgte dann neben der Erläuterung der klinischen Studie die Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien. Um eine ausreichende Bedenkzeit zu gewährleisten, wurde den Teilnehmern mindestens 2 Wochen vor Studienbeginn eine ausführliche Probandeninformation per Post zugesandt.

Für die Probanden galten folgende Einschlusskriterien:

- Männer im Alter zwischen 30 – 60 Jahren
- Raucheranamnese über mindestens 15 Jahre
- Aktives Rauchen, durchschnittliches Rauchen von mindestens 10 Zigaretten pro Tag
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung


Folgende Ausschlusskriterien galten für alle Studienteilnehmer:

- Jede Art von akuten und chronischen Erkrankungen (außer COPD oder Hypertonus)
- Regelmäßige Einnahme oder Inhalation von Medikamenten (außer Antihypertensiva)
- Nachweis einer FEV<sub>1</sub> (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) von < 80% vom Soll in der Bodyplethysmographie
- Nachweis einer Sauerstoffsättigung von < 90% in der Pulsoxymetrie
- Asthma bronchiale (gesicherte Diagnose oder Angabe von typischen Symptomen)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie in den letzten 60 Tagen

- Umstände, die eine regelmäßige Einnahme der Studienmedikation unwahrscheinlich erscheinen lassen (z.B. mangelnde Compliance, Probleme beim Umgang mit dem Discus)
- Akute Infektion der unteren Atemwege in der Woche vor Beginn der Studie
- Allergie gegen Lidocain (Lokalanästhetikum für die Bronchoskopie)
- Bekannte Unverträglichkeit gegenüber eine der Studienmedikationen

Jeder der Teilnehmer unterzeichnete eine Einverständniserklärung und willigte damit in die Teilnahme an der klinischen Studie ein. Die Studie wurde entsprechend den Richtlinien der Good Clinical Practice (CPMP/ICH/135/35) und dem Arzneimittelgesetz (AMG) durchgeführt. Erst nach Vorlage eines positiven Votums der zuständigen Ethikkommission (Mecklenburg-Vorpommern) und der Genehmigung des Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) wurde die Studie begonnen (Abb. 6 und Abb. 7). Die Studie begann am 18.05.2009 und endete am 21.09.2009.

**Klinische Prüfung**

 **BfArM**  
Bundesinstitut für Arzneimittel  
und Medizinprodukte

BfArM • Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3 • D-53175 Bonn

University Rostock  
Herrn Dr. Marek Lommatzsch  
E.-Heydemann-Str. 06  
18057 Rostock

Postanschrift:  
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3  
D-53175 Bonn  
http://www.bfarm.de  
Telefon: (0228) 207-4318  
(0228) 99307-4318  
Telefax: (0228) 207-5207  
(0228) 99307-5207  
e-mail: klinpruefung@bfarm.de

**Nachrichtlich:**  
Landesbehörde  
Mecklenburg-Vorpommern  
Ethikkommission der Med. Fakultät Universität  
Rostock

per Fax: +49 381-494-7392  
Ihre Zeichen und Nachricht vom

Gesch.Z.: Bitte bei Antwort angeben

(0228) 99307- Bonn,

04.02.2009  
26.02.2009  
16.03.2009  
23.04.2009

61-3910-4035007

4318

11. Mai 2009

**Betr.: Antrag auf Genehmigung einer klinischen Prüfung § 42 Abs. 2 AMG,  
Inhaltliche Prüfung der Antragsunterlagen gemäß § 9 Abs. 1 GCP-V**

Eingangsdatum BfArM	:	07.02.2009
Mängelschreiben	:	17.02.2009 / 09.03.2009 / 24.03.2009
Eingang nach Formalprüfung	:	27.02.2009 / 17.03.2009
Eingang nach Bescheid	:	24.04.2009
EudraCT-Nummer	:	2009-009459-40
Vorlage-Nummer	:	4035007
Sponsor	:	University Rostock
Legal representative Sponsor	:	./.
Prüfplancode des Sponsors	:	DC_und_COPD
Protokollversion	:	version 6 Version vom: 2009-01-28
IMP Nummer	PR01	: Salmeterol als Xinafoat 50 µg/Einzeldosis, Fluticasonpropionat 250 µg/Einzeldosis, einzeldosiertes Pulver zur Inhalation (Viani 50µg/250 µg Diskus, Zul.-Nr.: 44918.01.00)
IMP Nummer	PR02	: Fluticasonpropionat, 250 µg/Einzeldosis, einzeldosiertes Pulver zur Inhalation (Flutide 250 Diskus, Zul.-Nr.: 56290.03.00)
IMP Nummer	PL01	: Placebo zu PR1, PR2 (einzeldosiertes Pulver zur Inhalation)

**Titel der klinischen Prüfung :**  
Prüferinitiierte placebokontrollierte randomisierte Pilotstudie zum Einfluß von Fluticasone und Salmeterol auf Dendritische Zellen (DC) von Rauchern mit COPD im Stadium 0 oder 1 nach GOLD  
[Investigator initiated placebo controlled randomized Pilot trial of the Influence of Fluticasone and Salmeterol on Dendritic cells (DC) in Smokers with COPD stadium GOLD 0 or I]

**Leiter/in der klinischen Prüfung gemäß § 40 Abs. 1 Nr. 5 AMG:**  
Dr. Marek Lommatzsch, Rostock


 Das BfArM ist ein Bundesinstitut im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit.

Abb. 6 Genehmigung des BfArM, Seite 1.

- 2 -

**Bescheid**

Nach Durchsicht der bei uns am 24.04.2009 eingegangenen von Ihnen nachgereichten Unterlagen wurden alle in unserem Bescheid vom 15.04.2009 benannten Gründe für den Einspruch gegenstandslos. Die Durchführung der oben genannten klinischen Prüfung wird genehmigt.

Rechtsbehelfsbelehrung: Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, 53175 Bonn, schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

Die Unterlagen werden unter der o. g. Vorlagennummer verwahrt. Bitte geben Sie die Vorlage-Nr. und den Code des Prüfplans stets im weiteren Schriftverkehr zur o.g. klinischen Prüfung an und verwenden Sie als Postanschrift:

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Fachregistratur Z 14.2.06,  
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, **D-53175 Bonn**,  
Tel. +49 (0)228-207-4318, Fax +49 (0)228-207-5207

**Hinweis:** Wir weisen Sie darauf hin, dass entsprechend § 67 (1) AMG der Sponsor vor dem Beginn der klinischen Prüfung u. a. der Bundesoberbehörde sämtliche Prüfer (soweit erforderlich auch mit Angabe der Stellung als Hauptprüfer oder Leiter der klinischen Prüfung) und Prüfzentren anzuzeigen hat. Sollten die angegebenen Prüfzentren von denen im ursprünglich an die Bundesoberbehörde gestellten Antragsformular abweichen, ist dieses korrigiert als XML- und PDF-Datei nachzureichen. Für die Anzeige des Endes einer klinischen Prüfung benutzen Sie bitte das Formular Annex 3 der Leitlinie ENTR/CT1.

Sollten Prüfzentren während der Studie ab- oder angemeldet werden, ist nach positivem Votum der zuständigen Ethik-Kommission der Bundesoberbehörde zusätzlich ein aktualisiertes Antragsformular des Antrags auf Genehmigung einer klinischen Prüfung gemäß § 7 GCP-V als XML- (ausführliche Version) und PDF-Datei vorzulegen.

Mit freundlichen Grüßen  
im Auftrag

  
Dr. Christian Steffen

**Abb. 7** Genehmigung des BfArM, Seite 2.

## 2.2 Ablauf der Studie

Ein Überblick zum Ablauf der Studie gibt Abb. 8, das originale Studiendesign vom Studienprüfplan ist in Abb. 9 dargestellt. Die Untersuchung der Studienteilnehmer fand in der Zeit von 8 Uhr bis 12 Uhr vormittags statt. Dabei erfolgte zu Beginn die Aufklärung des potentiellen Studienteilnehmers in einem persönlichen Gespräch unter Verwendung der schriftlichen „Information für Studienteilnehmer“ (6.6). Insbesondere wurden die potentiellen Studienteilnehmer über die Weitergabe ihrer pseudonymisierten Daten im Rahmen der Dokumentations- und Mitteilungspflichten nach § 12 und § 13 GCP-V (Good Clinical Practice/ Guten Klinischen Praxis-Verordnung) an die dort genannten Empfänger aufgeklärt. Betroffene Personen, die der Weitergabe nicht zustimmten, wurden nicht in die klinische Prüfung eingeschlossen.

Durch eine gründliche Anamneseerhebung, welche die Dokumentation von persönlichen Daten, chronischen Erkrankungen, Allergien, der aktuellen Medikation und dem Rauchverhalten beinhaltete, und durch eine orientierende klinische Untersuchung wurde die Einhaltung der Ein- und Ausschlusskriterien überprüft.

Mit dem Erfüllen der Ein- und Ausschlusskriterien sowie dem Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte die Aufnahme des Probanden in die klinische Studie.

Folgende Untersuchungen bzw. Vorbereitungen schlossen sich an:

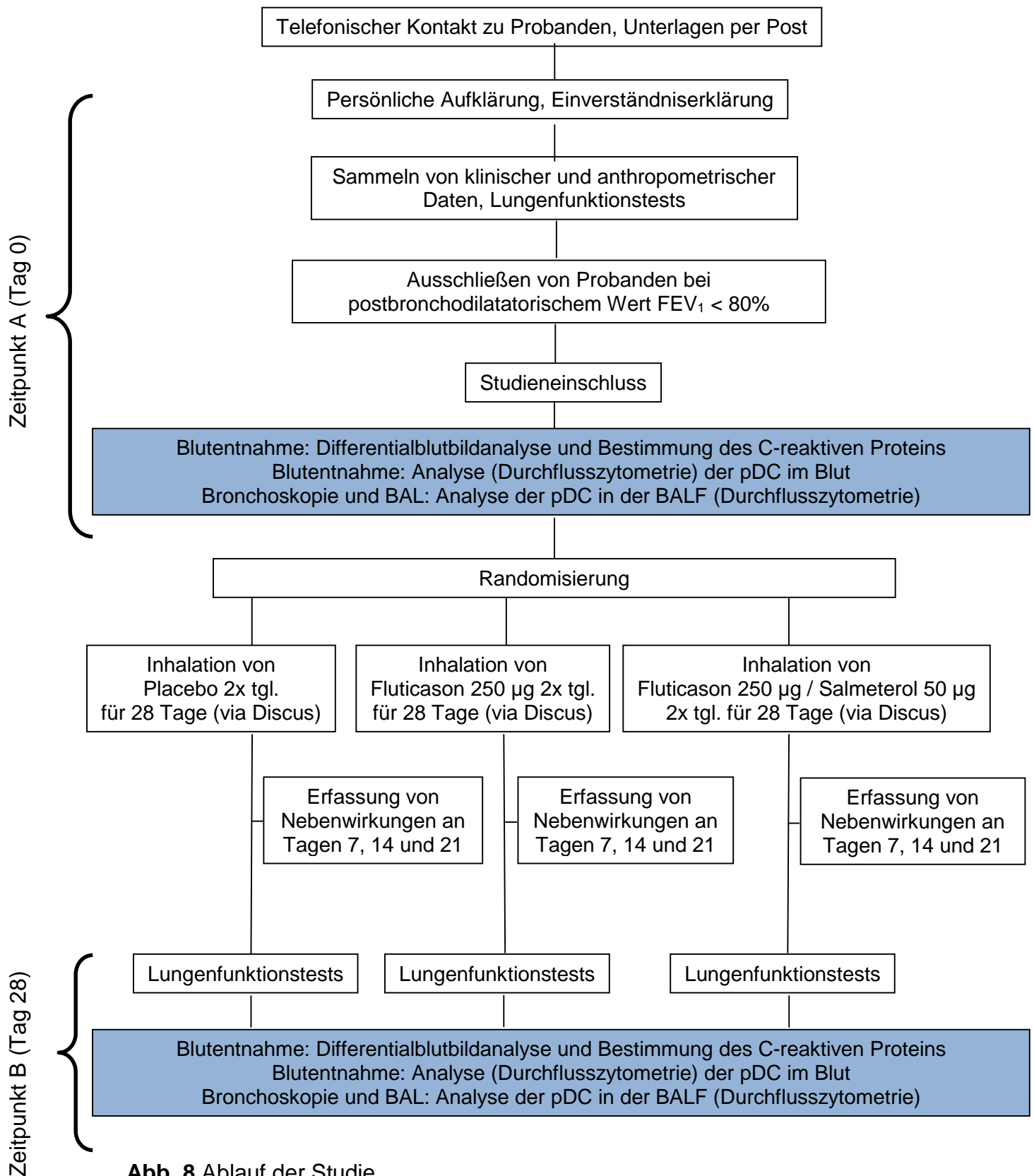
2.5 Bodyplethysmographie

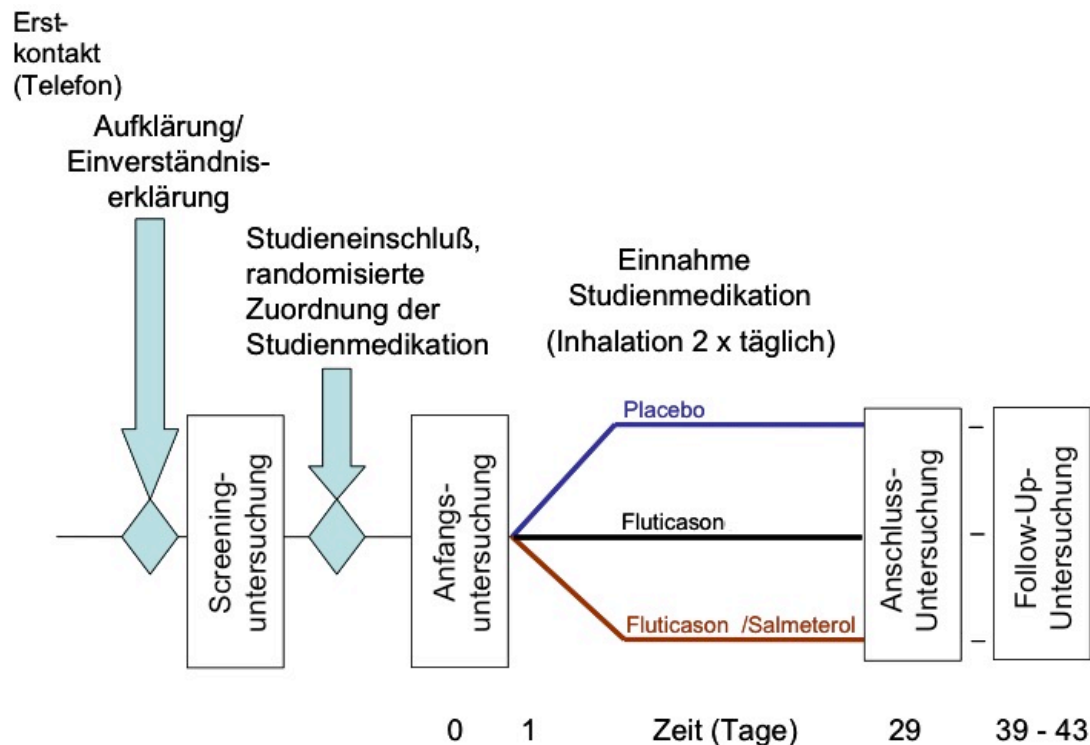
2.6 Körperliche Untersuchung

2.7 Anlage eines peripheren Venenzuganges mit Blutentnahme

2.8 Pulsoxymetrie

2.9 Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) und klinische Überwachung über 30 min. nach Bronchoskopie





**Abb. 9** Studiendesign laut Studienprüfplan (6.5).

## 2.3 Studienmedikation

Mit Aufnahme des Studienteilnehmers in die Studie bekam dieser eine Studiennummer und dementsprechend die Studienmedikation zugewiesen. Diese Zuweisung der Studiennummer erfolgte fortlaufend entsprechend dem Studieneinschluss. Der erste in die Studie aufgenommene Teilnehmer erhielt die Studien-Nummer 1 und somit die Studienmedikation, die mit der Nummer 1 bezeichnet ist. Der nachfolgende in die Studie aufgenommene Teilnehmer erhielt die Studiennummer 2 und die Studienmedikation mit der Ziffer 2 usw.

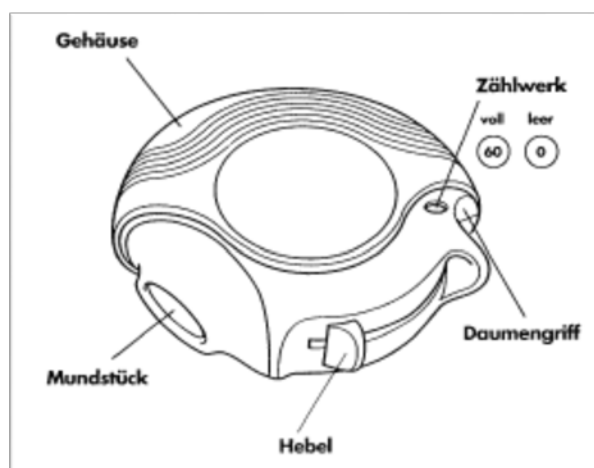
Es wurden 45 Studienteilnehmer eingeschlossen, wobei jeweils 15 Teilnehmer eine der drei verblindeten Studienmedikationen Placebo (P), Fluticason (F, entsprechend dem kommerziellen Präparat Flutide®) oder der Kombination von Fluticason+Salmeterol (F+S, entsprechend dem kommerziellen Präparat Viani®) erhielten. Die Verteilung der drei Studienmedikationen auf die Ziffern 1 – 45 erfolgte zuvor entsprechend einer Randomisierungsliste, die durch Prof. Kundt (Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universität Rostock) (Tab. 2) erstellt wurde. Die Wirkstoffe werden in Folge mit P, F oder F+S bezeichnet.

Patientennummer	Therapie
1	Fluticason+Salmeterol
2	Placebo
3	Fluticason+Salmeterol
4	Fluticason
5	Fluticason
6	Fluticason+Salmeterol
7	Placebo
8	Fluticason
9	Placebo
10	Fluticason
11	Placebo
12	Fluticason+Salmeterol
13	Fluticason
14	Fluticason+Salmeterol
15	Fluticason+Salmeterol
16	Fluticason
17	Placebo
18	Placebo
19	Fluticason+Salmeterol
20	Fluticason
21	Placebo
22	Fluticason+Salmeterol
23	Fluticason
24	Fluticason
25	Placebo
26	Fluticason+Salmeterol
27	Fluticason
28	Placebo
29	Fluticason+Salmeterol
30	Placebo
31	Fluticason
32	Placebo
33	Fluticason+Salmeterol
34	Fluticason
35	Placebo
36	Placebo
37	Fluticason
38	Fluticason+Salmeterol
39	Fluticason+Salmeterol
40	Placebo
41	Fluticason+Salmeterol
42	Fluticason
43	Fluticason
44	Fluticason+Salmeterol
45	Placebo

**Tab. 2** Randomisierungsliste der Probanden (Erstellung durch Prof. Kundt, während der Studie war die Zuordnung der Ziffern zu den Präparaten nur Prof. Kundt bekannt).



Die Studienteilnehmer inhalierten nach der Anfangsuntersuchung über einen Zeitraum von jeweils 28 Tagen täglich jeweils morgens und abends die Studienmedikation über einen Discus (Abb. 10).



**Abb. 10** Beispieldiscus mit Studienmedikation zur Inhalation.

Über den Discus wurde entweder Placebo, Fluticason oder Fluticason+Salmeterol inhaliert. Die verwendeten Inhalativa (Fluticason bzw. Fluticason+Salmeterol) sind zur Therapie der COPD zugelassen <sup>60</sup>.

Die Fertig-Prüfpräparate (einschließlich Placebo) wurden von dem Hersteller (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG) hergestellt und freigegeben. Die Verblindung und Nummerierung der Inhalatoren erfolgte durch GSK anhand der Randomisierungsliste von Prof. Kundt, entsprechend den gesetzlichen Anforderungen nach AMG §10 und GCP-V §5.

### **2.3.1 Fluticason (F, Flutide® 250 µg Discus)**

Flutide® 250 ist ein für die Therapie des Asthma bronchiale oder der COPD zugelassenes Arzneimittel (Zulassungsinhaber: GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG). Eine Einzeldosis mit 12,5 mg Pulver von Flutide® 250 Discus enthält 250 µg Fluticasonpropionat. Fluticason ist ein Glucocorticoid. Folgende Nebenwirkungen, die nicht unter Placebo auftraten, sind für Flutide® beschrieben: häufig (bei 1-10% der Patienten) Irritationen im Rachenraum, Husten, Heiserkeit, Verletzlichkeit der Haut (bei Langzeitstudien), Soorbefall der Mund- und Rachenschleimhaut,

Pneumonien; selten (bei 0,1-1% der Patienten) Hautausschlag, Urtikaria, Juckreiz, Überempfindlichkeits-Reaktionen.

### **2.3.2 Fluticason+Salmeterol (F+S, Viani® 50 µg / 250 µg Discus)**

Viani® 50 µg / 250 µg ist ein für die Therapie des Asthma bronchiale oder der COPD zugelassenes Arzneimittel (Zulassungsinhaber GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG). Jede Einzeldosis von Viani® 50 µg / 250 µg enthält 50 µg Salmeterol (als Salmeterolxinafoat) und 250 µg Fluticasonpropionat. Salmeterol ist ein langwirksames Beta-2-Mimetikum, auch LABA genannt (long-acting beta-receptor agonist). Folgende Nebenwirkungen, die nicht unter Placebo auftraten, sind für Viani® beschrieben: häufig (bei 1 - 10% der Patienten) Soorbefall im Mund- und Rachenraum, Tremor, Palpitationen, Irritation der Rachenschleimhaut, Heiserkeit/Dysphonie, Muskelkrämpfe, Hypokaliämie; selten (bei 0,1-1% der Patienten) Überempfindlichkeitsreaktionen mit Hautbeteiligung und Tachykardie.

### **2.3.3 Placebo (P)**

Als Placebo wurde ein durch den Hersteller der beiden anderen Studienmedikationen entworfener Discus mit dem gleichen Aussehen und den gleichen Hilfsstoffen ohne die spezifischen Wirkstoffe fabriziert.

## **2.4 Randomisierung, Verblindung und Entblindung**

Eine Randomisierungsliste (Tab. 2), die die zufällige Verteilung der einzelnen Studienmedikationen auf die Probandennummern 1 - 45 sicherstellt, wurde durch den verantwortlichen Biometriker Prof. Dr. Günther Kundt erstellt. Anhand dieser Randomisierungsliste wurde die Studienmedikation mit den Ziffern 1 - 45 beschriftet. Diese Beschriftung der Prüfpräparate mit der Probandennummer (und somit der zugeordneten Studienmedikationsnummer) stellt einen Identifizierungscode entsprechend GCP-V §5 dar.

Weder die Prüfarzte noch die Studienteilnehmer waren über die Zuordnung der einzelnen Studienmedikationen zu den Studienmedikationsnummern informiert, somit handelt es sich um eine

doppelblinde, randomisierte Studie. Alle Studienteilnehmer erhielten identisch aussehende Disci, so dass keine Rückschlüsse auf die jeweilige Studienmedikation möglich waren. Die Randomisierungsliste war nur dem Hersteller und dem Biometriker zugänglich.

Mit der Studienmedikation wurden ebenfalls 45 einzelne verschlossene, fortlaufend mit den Studiennummern 1 bis 45 bezeichnete Umschläge an das Studienzentrum übermittelt, in denen die zu der Studiennummer zugehörige Studienmedikation unverschlüsselt niedergelegt wurde. Wenn im weiteren Verlauf während der Studienphase eine Entblindung der Studienmedikation beim Auftreten von SAE (serious adverse event: schwerwiegende Nebenwirkung) oder für die weitere Therapie des Studienteilnehmers notwendig geworden wäre, wäre nur der Umschlag mit der entsprechenden Studiennummer zu öffnen gewesen. Dieses wäre mit Grund des Öffnens, Datum, Uhrzeit und Namen des Öffnenden zu dokumentieren gewesen.

Nach Abschluss der Studienphase und vor Beginn der statistischen Auswertung erfolgte durch den Biometriker anhand der von ihm erstellten Randomisierungsliste die Zuordnung der einzelnen Studienteilnehmer zu den Studienmedikationen.

## **2.5 Bodyplethysmographie**

### **2.5.1 Material**

1. Bodyplethysmograph mit Auswertungssoftware [JAEGER, Würzburg, D]
2. Mundstück und Nasenklemme [JAEGER, Würzburg, D]

### **2.5.2 Methode**

Die Bodyplethysmographie ist eine Untersuchung zur Messung dynamischer und statischer Lungenparameter. Es steht ein modernes Messgerät (Masterscreen, Fa. Jäger-Viasys, Masterscreen, Höchberg, Deutschland) (Abb. 11) und geschultes Assistenzpersonal in der Abt. für Pneumologie zur Verfügung. Diese Methode erlaubt neben der Erfassung dynamischer Parameter mit großer Sensitivität eine Bestimmung des

Atemwegswiderstandes und statischer Lungenvolumina (inklusive der Residualkapazität und der totalen Lungkapazität) und stellt gegenwärtig die umfassendste Methode zur Erfassung der Lungenfunktion dar. Ein Beispiel des Ergebnisses einer Lungenfunktion ist in Abb. 12 dargestellt. Für die Messung der Atemstromstärke ist der Patient an einen Pneumotachographen (über Mundstück) angeschlossen. Durch die Änderung seines Körpervolumens während der Atmung kommt es zu Druckveränderungen in der Kammer, die aufgezeichnet werden. Man erhält ein Druck-Strömungsdiagramm, welches über das Verhalten des Strömungswiderstandes während eines gesamten Atemzyklus genauere Aussagen erlaubt, als es mit den sonstigen Methoden möglich ist. Teil der bodyplethysmographischen Messungen ist auch eine einfache Spirometrie. Mit dieser Methode werden die mobilisierbaren Lungenvolumina (z.B. die forcierte expiratorische Vitalkapazität in der ersten Sekunde, FEV<sub>1</sub>) und die Strömungsgeschwindigkeiten erfasst.




**Abb. 11** Bodyplethysmograph der Abteilung für Pneumologie (Universität Rostock).

### 2.5.3 Durchführung

Der Proband sitzt in bequemer aufrechter Haltung in der luftdicht abschließbaren Kammer des Bodyplethysmographen. Nach einigen Minuten der Gewöhnung sowie der Erläuterung des folgenden Ablaufs wird der Proband gebeten, das Mundstück des Pneumotachographen in den Mund zu nehmen und vollständig mit den Lippen zu umschließen. Anschließend wird ihm die Nase mittels einer Nasenklemme verschlossen. Nach dem Schließen der Tür wird mit den Messungen begonnen und der Proband dazu aufgefordert, gleichmäßig über das Mundstück ein- und auszuatmen. Ein- und Ausatmung erfordern durch eine Druckdifferenz eine treibende Kraft, welche die Messung des Atemflusses ermöglicht.

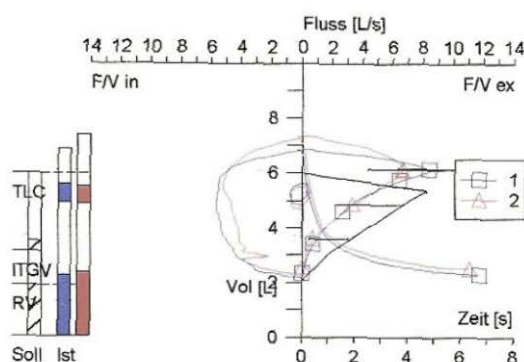
Initial werden so lange Druckstromdiagramme geschrieben und verworfen, bis der durch den Temperatenausgleich bedingte Drift nicht mehr vorhanden ist. In der Regel werden drei akzeptable Druckströmungsdiagramme aufgezeichnet, wobei eine weitgehende Deckungsgleichheit bestehen sollte. Entsprechen die auf dem Bildschirm dargestellten Widerstandskurven den Kriterien bei Ruheatmung, wird die Verschlussdruckmessung gestartet. Während des Verschlusses des Atemrohres soll der Proband möglichst normal weiteratmen bis zur Öffnung der Klappe. Mit dieser Technik wird das intrathorakale Gasvolumen, welches nach normaler Expiration im Thorax verbleibt, bestimmt. Es folgt ein weiterer Verschluss, nach dessen Öffnung das Tiffeneau-Manöver durchgeführt wird. Dabei wird der Proband aufgefordert, langsam maximal auszuatmen, danach zügig und vollständig einzuatmen und mit möglichst geringer Pause (unter 1s) so schnell und stark wie möglich auszuatmen. Sobald ein Plateau im zeitlichen Volumenverlauf sichtbar wird bzw. dem Probanden eine weitere Expiration nicht mehr möglich ist, wird die normale Atmung fortgesetzt, und die Untersuchung ist beendet.

Universität Rostock  
Medizinische Fakultät  
Klinik für Innere Medizin  
Ernst-Heydemann-Str.  
18057 Rostock

Name:   
Vorname:  
Geburtsdatum:  
Identifikation: 806/09  
Straße:

Station:  
Einw. Arzt:  
Größe: 164,0 cm  
Gewicht: 60,0 kg  
Wohnort:

Komplexe Lungenfunktionsdiagnostik: Spirometrie / Bodyplethysmographie



		A		B			
		Soll	Ist1	%I1/S	Ist2	%I2/S	%I2/I1
Datum		18.05.09			15.06.09		
Zeit		09:20:39			09:07:17		
VT	[L]	0.43	0.70	164.2	0.67	156.1	95.1
BF	[l/min]	20.00	16.76	83.8	14.58	72.9	87.0
MV	[L/min]	8.57	11.80	137.6	9.76	113.8	82.7
VC IN	[L]	4.09	3.74	91.3	5.05	123.4	135.2
VC EX	[L]	4.09	3.82	93.4	4.84	118.2	126.5
FVC	[L]	3.94	4.57	116.0	4.84	122.9	105.9
FEV 1	[L]	3.26	3.23	99.3	3.58	110.0	110.8
FEV 1 % FVC	[%]		70.81		74.08		104.6
MVV	[L/min]	121.03					
PEF	[L/s]	8.28	8.41	101.5	6.65	80.2	79.1
MEF 75	[L/s]	7.18	6.48	90.2	6.64	92.5	102.6
MEF 50	[L/s]	4.47	2.65	59.2	3.34	74.6	126.0
MEF 25	[L/s]	1.77	0.73	41.0	0.72	40.7	99.1
SR tot	[kPa*s]	1.18	0.72	61.1	0.68	57.8	94.6
SR eff	[kPa*s]	1.18	0.36	30.5	0.29	24.9	81.5
R tot	[kPa*s/L]	0.30	0.14	45.5	0.13	43.5	95.6
R eff	[kPa*s/L]	0.30	0.07	22.7	0.06	18.7	82.4
R IN	[kPa*s/L]		0.25		0.11		45.5
R EX	[kPa*s/L]		0.20		0.18		91.2
ITGV	[L]	3.15	4.92	156.0	4.88	154.7	99.1
ERV	[L]	1.24	2.66	213.6	2.51	202.1	94.6
RV	[L]	1.91	2.26	118.5	2.36	123.8	104.5
TLC	[L]	6.02	6.90	114.6	7.42	123.1	107.5
RV % TLC	[%]	31.51	32.76	104.0	31.86	101.1	97.3

**Abb. 12** Originalbefund der Lungenfunktionsprüfung eines Probanden an den Zeitpunkten A und B.

## 2.6 Körperliche Untersuchung

Zum ersten Termin, dem Zeitpunkt A (Abb. 8), wurde eine körperliche Untersuchung des Probanden durchgeführt. Diese beinhaltete neben der Beurteilung des Allgemein- und Ernährungszustandes, die gründliche Inspektion, Perkussion und Auskultation aller Körperregionen. Zusätzlich wurden folgende Vitalparameter erhoben:

1. Blutdruck
2. Puls
3. Körpertemperatur im Ohr
4. Atemfrequenz
5. Sauerstoffsättigung des Blutes

Anhand der erhobenen Parameter wurde die Tauglichkeit des Probanden unter Einbeziehung der Ausschlusskriterien (2.1) beurteilt. Auffälligkeiten wurden dokumentiert und mit dem Prüfarzt besprochen. Des weiteren wurden Befindlichkeitsstörungen sowie subjektive und objektive Krankheitssymptome vermerkt, um so die im Zusammenhang mit der verabreichten Studienmedikation vorbeschriebenen Nebenwirkungen besser erfassen zu können.

Folgende mögliche unerwünschte Ereignisse der wirkstoffhaltigen Studienmedikation wurden an den Tagen 0 (Zeitpunkt A), 7, 14, 21 und 28 (Zeitpunkt B) erfragt (6.7):

1. Irritationen im Rachenraum/der Rachenschleimhaut
2. Soorbefall (Candidainfektion) der Mund- und Rachenschleimhaut
3. Husten
4. Heiserkeit/Dysphonie
5. Infektzeichen
6. Hautausschlag
7. Urtikaria (Nesselsucht)
8. Juckreiz
9. Tremor
10. Palpitationen/Tachykardie
11. Muskelkrämpfe

## **2.7 Anlage eines peripheren Venenzuganges mit Blutentnahme**

### **2.7.1 Material**

1. Stauschlauch
2. Sterile Wattetupfer [PAUL HARTMANN, Heidenheim, D]
3. Hautdesinfektion mit Octeniderm® [SCHÜLKE&MAYR, Norderstedt, D]
4. Flexüle 20G [B. BRAUN, Melsungen, D]
5. Kanülenfixierung mit Leukomed® IV [BSN MEDICAL, Hamburg, D]
6. 2 Monovetten EDTA 2,7 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
7. Monovette Li-Heparin 2,7 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
8. Serum Monovette 7,5 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]

### **2.7.2 Methode und Durchführung**

Für die Punktion eines Blutgefäßes wurde das venöse Blut durch das Anlegen eines Stauschlauches gestaut. Anschließend wurde die Haut an der entsprechenden Stelle gründlich desinfiziert und eine Venenverweilkanüle angelegt. Im Rahmen dieser Maßnahme fanden gleichzeitig die Blutentnahmen statt. Es wurden folgende Röhrchen (Abb. 13) (insgesamt ca. 15 ml) abgenommen:

1. 1 EDTA-Röhrchen (2,7 ml) zur FACS-Analyse der DC im Blut  
(Pneumologisch-Immunologisches Forschungslabor)
2. 1 EDTA-Röhrchen (2,7 ml) zur Differentialblutbildbestimmung  
(Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin)
3. 1 Lithium-Heparin-Röhrchen (2,7 ml) zur CRP-und Elektrolyt-  
Bestimmung (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin)
4. 1 Serum- Röhrchen (7,5 ml) zur Aliquotierung  
(Pneumologisch-Immunologisches Forschungslabor)





**Abb. 13** Blutentnahme. Dargestellt sind Serum-, Li-Heparin- und EDTA-Monovetten.

### 2.7.3 Blutwertmessungen

Die Messungen des Differentialblutbildes, des CRP und der Elektrolyte erfolgte im Zentrallabor der Universitätsklinik Rostock, welches im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin angesiedelt ist. Die Ermittlung des Differentialblutbildes erfolgte mit einem hämatologischen Analysegerät (XE, 2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Die CRP - Bestimmung wurde mittels eines Synchron LX 20 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) durchgeführt.

## 2.8 Pulsoxymetrie

Die Pulsoxymetrie ist ein Verfahren zur nicht-invasiven Ermittlung der arteriellen Sauerstoffsättigung über die Messung der Lichtabsorption bzw. der Lichtremission bei Durchleuchtung der Haut. Die Messung erfolgt mit einem Sättigungsaufnehmer (Clip - Nonin Onyx, Nonin Medical, Inc., Plymouth, Minnesota, USA) an einem leicht zugänglichen Körperteil, vorzugsweise an einem Finger. Im Clip befinden sich zwei in einem definierten Bereich leuchtende Lichtquellen und ein Fotosensor. Durch die unterschiedliche Färbung des mit Sauerstoff gesättigten Hämoglobins entsteht für das

durchstrahlende Rotlicht eine unterschiedliche Absorption, die der Fotosensor misst. Über den Clip wird neben der Sättigung auch der Puls in den Kapillaren erfasst. Gemessen werden drei Werte: die Absorption des Lichts im 660 nm-Bereich, im 940 nm-Bereich und ohne die Strahlung der Messlichtquellen. Die unterschiedliche Absorption des Lichtes ergibt eine Differenz. Anhand eines Vergleichs des Messergebnisses mit einer Referenztabelle ermittelt das Gerät, welcher prozentuale Anteil der roten Blutkörperchen mit Sauerstoff gesättigt ist (Sauerstoffsättigung).

## **2.9 Flexible Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL)**

### **2.9.1 Material**

- |   |  |
|---|--|
| 1. Flexibles Bronchoskop  | [OLYMPUS, Hamburg, D]                  |
| 2. Bronchoskopie – Arbeitsplatz WM-N60                                    | [OLYMPUS, Hamburg, D]                  |
| 3. Tracheal-Saugsets  | [UNOMEDICAL, Hamburg, D]               |
| 4. Spritzen BD Discardit II® (5 u. 10 ml)                                 | [B. DICKINSON, Heidelberg, D]          |
| 5. Isotone Kochsalzlösung 0,9%  | [B. BRAUN, Melsungen, D]               |
| 6. Sauerstoffbrille   | [ASID BONZ, Herrenberg, D]             |
| 7. Pari-Inhalierboy   | [PARI-WERK GMBH,<br>Starnberg, D]      |
| 8. Inhalat: Lidocain – Hydrochlorid 4%ig +<br>Salbuhexal® – Fertiginhalat | [HEXAL, Holzkirchen, D]                |
| 9. Xylocain® – Pumpspray  | [ASTRAZENECA, Wedel, D]                |
| 10. Xylocain® – Viskös 2%ig   | [ASTRAZENECA, Wedel, D]                |
| 11. Schleimhautanästhesie: Lidocain – Hydrochlorid 2 und 4%ig             | [ZENTRALAPOTHEKE Uniklinik<br>Rostock] |
| 12. Midazolam - ratiopharm 5 mg/5 ml                                      | [RATIOPHARM, Ulm, D]                   |

### **2.9.2 Methode und Durchführung**

Die Methode der flexiblen Bronchoskopie inklusive der bronchoalveolären Lavage (BAL) ist eine Routineuntersuchung in der Abt. für

Pneumologie. Es stehen moderne Bronchoskopiegeräte und eine vollständig ausgestattete Bronchoskopie-Abteilung mit spezifisch geschultem Assistenzpersonal zur Verfügung (Abb. 14). Vor der Bronchoskopie wird eine Venenverweilkanüle am Arm des Patienten angelegt, und der Patient inhaliert 15 Minuten lang 4% Lidocain über Pari-Boy zur Betäubung der Schleimhäute. Während der Bronchoskopie wird der Patient mittels Monitor (Pulsoxymetrie und Blutdruckmessung) ständig überwacht. Das Bronchoskop wird über die Nase in die rechte Lunge eingeführt. Es wird danach ein Subsegment des Mittellappens mittels Bronchoskop intubiert und mit insgesamt 100 ml einer vorgewärmten physiologischen Kochsalzlösung schrittweise gespült. Die Spülflüssigkeit (die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit, BALF) wird zur weiteren Diagnostik asserviert. Für die Bodyplethysmographie und Pulsoxymetrie von Rauchern sind in der Literatur und in der Abt. für Pneumologie keine Risiken bekannt. Die Technik der BAL mittels Bronchoskopie ist bei Rauchern mit ausreichender Lungenfunktion ( $FEV_1 > 30\%$  vom Soll oder  $> 1,5$  Liter) eine sichere und komplikationsarme Methode <sup>61</sup>. Schwere oder vital bedrohliche Beeinträchtigungen der Studienteilnehmer sind bei alleiniger BAL (ohne Biopsie und ohne Deposition von Wirkstoffen oder Allergenen) nicht beschrieben. Während der Bronchoskopie können Hustenreiz und Brennen im Pharynx auftreten, dies wird jedoch meist als wenig beeinträchtigend empfunden. Unverträglichkeiten bei der Inhalation des Lokalanästhetikums sind selten. Diese Unverträglichkeiten werden bereits vor der Bronchoskopie erkannt (Atemwegsverschleimung, selten: zunehmende Atemnot) und werden durch Abbruch der Inhalation und der anschließenden Untersuchung behandelt. Eventuell auftretende Bronchialobstruktionen während der Bronchoskopie können durch die Gabe von Beta-2-Mimetika, Theophyllin i.v. oder erforderlichenfalls einmalige intravenöse Applikation eines Corticoidderivates rasch behoben werden. Sollte eine Sedierung bei ausgeprägter Ängstlichkeit oder Unruhe des Probanden notwendig sein, können bis zu 5 mg Midazolam i.v. appliziert werden. Diese Maßnahme erfordert jedoch eine klinische Verlaufsbeobachtung über 2 Stunden nach Bronchoskopie (anstatt von 30 min.).



**Abb. 14** Durchführung einer flexiblen Bronchoskopie (OÄ Dr. Bier, Schwester Grit Wentzien und Schwester Gesine Fastnacht).

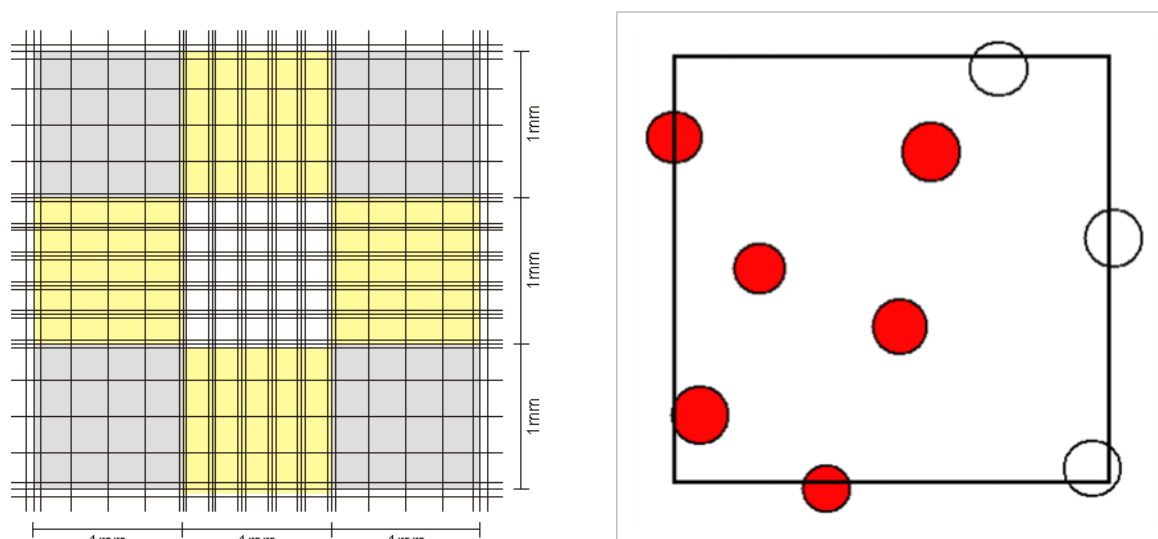
## 2.10 Aufbereitung der BALF inklusive Zellzählung

### 2.10.1 Material

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 1. Zellsieb 70 µm BD Falcon                       | [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D]   |
| 2. Sterile Falcon-Röhrchen 50 ml                  | [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D]   |
| 3. Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R               | [KENDO LAB. PRODUCTS, Hanau, D]     |
| 4. Arbeitspuffer (Puffer mit Fetalem Kälberserum) |                                     |
| 5. Hemacolor-Färbekit                             | [MERCK, Darmstadt, D]               |
| 6. Türk'sche Lösung                               | [MERCK, Darmstadt, D]               |
| 7. Objektträger                                   | [ENGELBRECHTMLT GmbH, Edermünde, D] |
| 8. Neubauer-Zählkammer                            | [ROTH, Karlsruhe, D]                |
| 9. Durchlichtmikroskop                            | [CARL-ZEISS, Jena, D]               |
| 10. Heraeus Multifuge 1L-R Centrifuge             | [THERMOSCIENTIFIC]                  |

### 2.10.2 Methode und Durchführung

Die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurde zunächst durch ein 2-Schicht-Zellsieb filtriert, zur Entfernung von Verunreinigungen bzw. größeren Partikeln. Nachfolgend wurde die BALF in sterile Falconröhrchen gefüllt. Für die Zelldifferenzierung wurden hiervon 5 ml abpipettiert und 2 Tropfen 30%iger Rinderalbuminlösung hinzugegeben. Es schloss sich die Sedimentation auf Objektträger an. Nach Trocknung dieser Objektträger erfolgte die Fixierung und Färbung mittels eines kommerziellen Hemacolor-Färbekits. Die Zelldifferenzierung wurde mittels Mikroskop anhand von standardisierten morphologischen Kriterien für Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten (eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten) durchgeführt. Die sterilen Falconröhrchen mit der BALF wurden bei Raumtemperatur mit 320 x g (g = Erdbeschleunigung) für 10 min. zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 50 ml Waschpuffer resuspendiert, bevor eine erneute Zentrifugation (Raumtemperatur, 320 x g, 10 min.) und abschließend eine Resuspendierung in 1 ml Waschpuffer erfolgten. Ein geringer Teil (10 µl) der resultierenden Zellsuspension wurde zu 90 µl Türk'scher Lösung gegeben und für die Zellzählung (Neubauer - Zählkammer) verwendet, der Rest wurde für die durchflusszytometrisch Untersuchungen asserviert. Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (Abb. 15). Die Ergebnisse der Zellzählung wurden als Gesamtzellzahl pro Milliliter der gewonnenen Lösung angegeben.



**Abb. 15** Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer.

In der linken Abbildung ist die gesamte Neubauer-Zählkammer (mit 3 x 3 Quadraten) dargestellt. Die Zellsuspension wird auf die Kammer aufgetropft, diese Suspension verteilt sich unter das aufgelegte Deckglas durch Kapillarkräfte. Zwischen Zählnetz und Deckglas besteht ein Abstand von 0,1 mm (Kammertiefe). Das erfasste Volumen entspricht bei einem großen Quadrat 0,1  $\mu\text{l}$ . In allen 4 Eckquadraten werden die Zellen ausgezählt. Hierbei werden die Felder von links nach rechts dann rechts nach links ausgezählt, Reihe für Reihe. In der rechten Abbildung ist gezeigt, dass dabei die Zellen gezählt werden, die auf der linken oder unteren Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren. Zellen, die auf der oberen oder rechten Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren, werden nicht mitgezählt. Gefüllte Kreise (●) werden mitgezählt, nicht gefüllte (○) nicht. Aus der Summe der gezählten Zellen wird für alle 4 Eckfelder der Mittelwert errechnet, dieser Wert multipliziert mit 10000 ergibt die Zellzahl / ml Zellsuspension.

## 2.11 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

### 2.11.1 Material

- |  |  |
|--|--|
| 1. Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R          | [KENDO LAB. PRODUCTS,<br>Hanau, D]     |
| 2. Tischzentrifuge MiniSpin                  | [EPPENDORF, Hamburg, D]                |
| 3. Durchflusszytometer FACSCalibur           | [B. DICKINSON, Heidelberg, D]          |
| 4. FACS – Software CellquestPro              | [B. DICKINSON, Heidelberg, D]          |
| 5. Pipette Research 100 – 1000 $\mu\text{l}$ | [EPPENDORF, Hamburg, D]                |
| 6. Pipette Research 20 – 200 $\mu\text{l}$   | [EPPENDORF, Hamburg, D]                |
| 7. Pipettenspitzen blau 1000 $\mu\text{l}$   | [GREINER<br>BIO-ONE, Frickenhausen, D] |
| 8. Pipettenspitzen gelb 20 $\mu\text{l}$     | [GREINER<br>BIO-ONE, Frickenhausen, D] |

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| 9. Reaktionsgefäße 1,0 ml  | [SARSTEDT, Nümbrecht, D]           |
| 10. Falcon – Röhrchen FACS 5 ml  | [B. DICKINSON, Heidelberg, D]      |
| 11. PBS (phosphate buffered saline)                                    | [INVITROGEN GmbH,<br>Karlsruhe, D] |
| 12. FCS (Fetales Kälberserum)  | [INVITROGEN GmbH,<br>Karlsruhe, D] |
| 13. FACS Lysing Solution   | [B. DICKINSON, Heidelberg, D]      |
| 14. Antikörper – Verdünnungslösung:                                    |                                    |
| 49,5ml FACS - Puffer + 0,5ml $\text{NaN}_3$ - Stammlösung              |                                    |
| (FACS - Puffer: PBS + 2% FCS, $\text{NaN}_3$ - Stammlösung [10%]: 1 g  |                                    |
| $\text{NaN}_3$ - Pulver aufgelöst in 10 ml Aquadest)                   |                                    |
| 15. Antikörper-Gebrauchslösung:  |                                    |
| 980µl Antikörper-Verdünnungslösung + 20 µl Stammlösung des Herstellers |                                    |
| 16. Monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper (Tab. 3)                    |                                    |

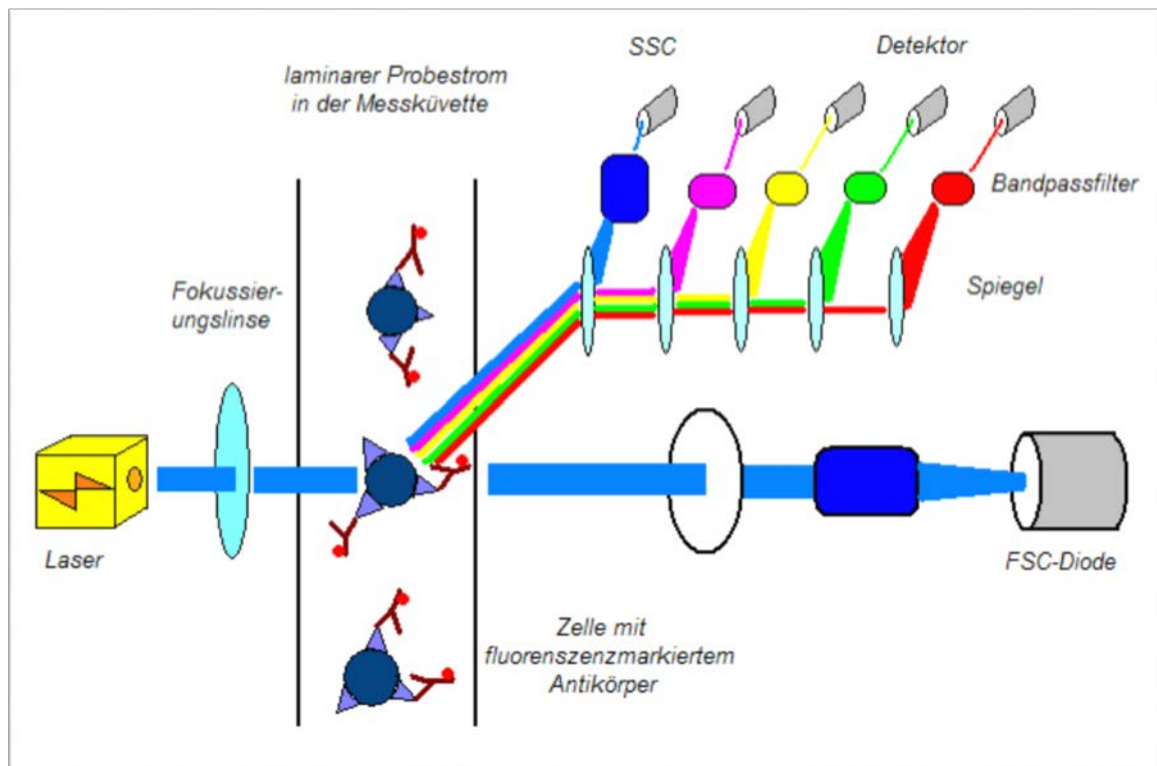
### 2.11.2 Methode

Die Methode der Durchflusszytometrie von DC in der BALF ist eine etablierte Untersuchung in der Abt. für Pneumologie der Universität Rostock<sup>25, 17, 59</sup>. Durch fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (sogenannte FACS-Analyse) können DC und deren Oberflächenmoleküle (Marker) quantitativ bestimmt werden. Grundlage der Methode ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Über Photodetektoren kann die Ablenkung des Strahles senkrecht zur Bewegungsachse (Seitwärtsstreuung, sideward scatter, SSC) gemessen werden, wodurch sich Informationen über die innere Struktur der Zellen (unter anderem Granularität des Zytoplasmas)

ermitteln lassen. Die gemessene Absorption des Lichtes entlang des Strahlenganges (Vorwärtsstreuung, forward scatter, FSC) gilt als ein Maß für die Größe der Zellen (Abb. 16).

Durch Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist eine Analyse mehrerer Oberflächenmarker auf einer Zelle möglich. Drei der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Phytoerythrin (PE), Cytochrom-5 (Cy5) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Auf Anregungen durch Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert Cy5 tiefrotes Licht der Wellenlänge 650 nm, PE orangefarbenes Licht der Wellenlänge 585 nm und FITC grünes Licht einer Wellenlänge von 530 nm. Durch Darstellung der gespeicherten Daten in Koordinatensystemen (Dotplots) können sowohl die Informationen über Größe und Granularität (FSC, SSC) als auch die spezifischen Oberflächenmarker ausgewertet werden. Die Achsen des Diagramms werden durch zwei der gemessenen Parameter gebildet und jede Zelle gemäß den bei ihr gemessenen Größen als Punkt eingetragen. Die sich daraus ergebenden Punktwolken repräsentieren die unterschiedlichen Populationen in der analysierten Zellgesamtheit (Abb. 17). Eine Negativkontrolle mit unmarkierten Kontroll-Antikörpern führt zum Ausschluss derjenigen Zellen bzw. Zelltrümmer, die die Kontroll-Antikörper unspezifisch gebunden haben. Mit Hilfe der Software ist es möglich, eine Auswahl bestimmter Zellpopulationen durch sogenannte „Gates“ zu treffen. Der prozentuale Anteil der im Gate eingekreisten Zellen an der Gesamtpopulation aller Zellen lässt sich dann genau quantifizieren.





**Abb. 16** Das optische System eines Durchflusszytometers.

Ein Laser sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge aus (z.B. 488 nm). Nach Fokussierung trifft es in einer Messküvette auf den Probestrom, wird gestreut und reflektiert. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht verschiedener Wellenlänge. Ein System aus verschiedenen Spiegeln und Filtern trennt die abgehende Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen. Der jeweilige Anteil wird über Detektoren registriert. Die Größe der Partikel (FSC-Diode), deren Granularität (SSC) sowie bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können mit dem hier dargestellten Setup bestimmt werden.

### 2.11.3 Durchführung

Die Durchflusszytometrie erfolgte im Immunologischen Labor der Abt. für Pneumologie. Das entnommene EDTA-Blut und die aufbereiteten BALF-Zellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern (Tab. 3) für 20 min. inkubiert (5 µl Antikörper - Lösung pro 50 µl Zellsuspension). Danach erfolgte die Zugabe von 1ml FACS Lysing Solution für 10 min. mit nachfolgender Zentrifugation der Zellen über einen Zeitraum von 5 min. (420 x g, Raumtemperatur). Nach dem Verwerfen des Überstands erfolgte eine Waschung: Zugabe von 1 ml Antikörper – Verdünnungslösung, mit nachfolgender Zentrifugation der Zellen über einen Zeitraum von 5 min. (420 x g, Raumtemperatur). Schließlich wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Die resultierende Lösung wurde dann mittels 4-Farben-Durchflusszytometer gemessen.

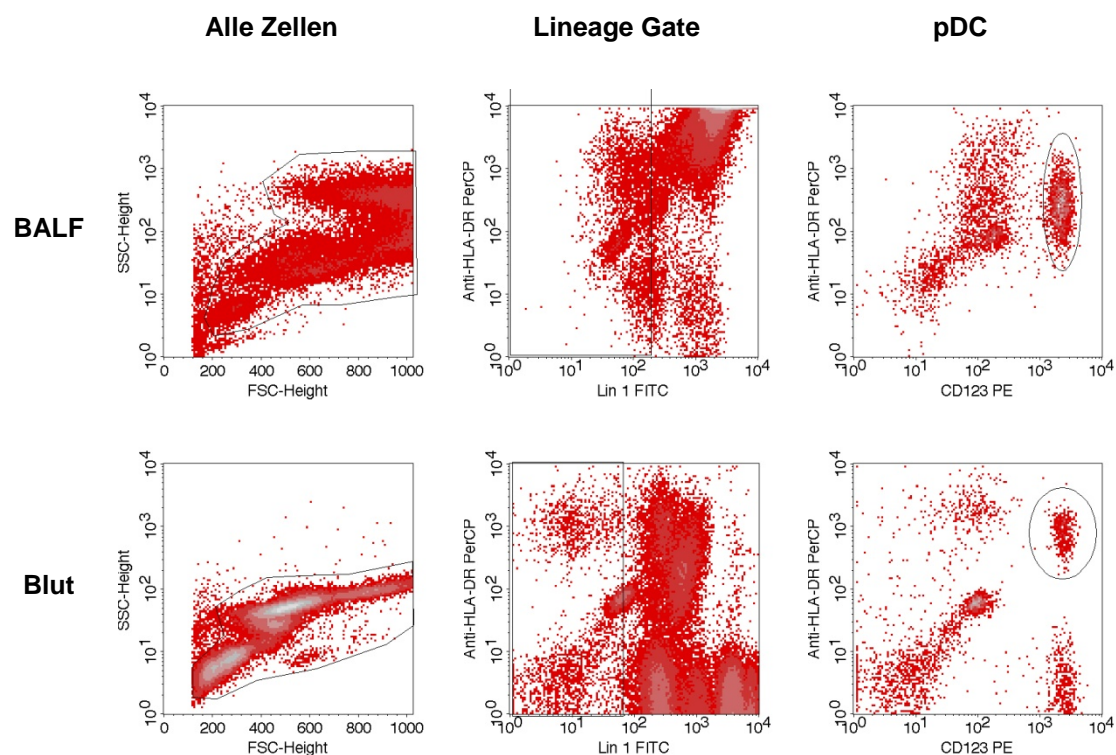
	Antigen	Farbstoff	Klon	Hersteller
<b>Lineage Cocktail</b>	CD3	FITC	SK7	BD Biosciences
	CD14	FITC	MfP9	BD Biosciences
	CD16	FITC	3G8	BD Biosciences
	CD19	FITC	SJ25C1	BD Biosciences
	CD20	FITC	L27	BD Biosciences
	CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences
<b>Andere Antikörper</b>	HLA-DR	PerCP	NA1/34	BD Biosciences
	Maus IgG 1	PE	S-HCL-3	BD Biosciences
	Maus IgG 1	APC	DCGM4	BD Biosciences
	Maus IgG2a	XPE	L243	BD Biosciences
	Maus IgG2a	APC	AD5-8E7	BD Biosciences
	CD123	PE	2D7	BD Biosciences
	BDCA-1	APC	19.2	Miltenyi
	BDCA-3	APC	DCN46	Miltenyi
	BDCA-4	APC		Miltenyi
	CCR5/CD195	APC		BD Biosciences
	CCR6	APC		R+D Systems
	CCR7	APC		R+D Systems
	CXCR3/CD183	APC		BD Biosciences
	CXCR4/CD184	APC		BD Biosciences

**Tab. 3** Antikörper für die Durchflusszytometrie.

#### 2.11.4 Analyse der Zellen

Zunächst wurden mittels SSC-FSC-Darstellung alle Zellen der Lösung dargestellt und alle Zellen in ein sogenanntes „Gate“ eingegrenzt (linke Spalte Abb. 17). Da DC sich dadurch auszeichnen, dass bei ihnen die Oberflächenmarker CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 (sogenannte „Lineage Marker“ für T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen, Monozyten und Granulozyten) kaum oder gar nicht detektiert werden können, konnten mittels eines handelsüblichen „Lineage Cocktails“ (Tab. 3) zunächst die Zellen mit geringer oder fehlender Expression der Lineage Marker (sogenannte  $\text{lin}^{\text{neg/dim}}$  Zellen) abgegrenzt werden (mittlere Kolumne Abb. 17). In der Population der  $\text{lin}^{\text{neg/dim}}$  Zellen konnten dann durch die Marker HLA-DR und CD123 die plasmazytoiden DC (pDC) identifiziert werden. Die pDC zeichnen sich durch eine starke Expression sowohl von HLA-DR als auch CD123 aus, und sind daher im rechten oberen Quadranten eingrenzbar und

analysierbar (rechte Kolumne Abb. 17). Die Quantifizierung der Expression der Oberflächenmarker (entweder in % der positiven pDC oder als mediane Fluoreszenzaktivität, MFI) erfolgte anhand von Histogramm-Plots, bei denen die Fluoreszenzintensität von Kontroll-Antikörpern mit der Fluoreszenzintensität von spezifischen Antikörpern (gegen die ausgewählten Oberflächenmarker) miteinander verglichen wurde <sup>62</sup>.



**Abb. 17** Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Parameter.

## 2.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 20.0.0 SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Die Daten waren nicht normal (nach Kolmogorov-Smirnov) verteilt, daher erfolgte die Darstellung der Parameter mittels der Medianwerte (Minimum-Maximum). Unterschiede in den Ausgangswerten zwischen den 3 Studienarmen wurden mittels Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben untersucht. Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten (A und B) in den Studienarmen wurden mittels des Wilcoxon Tests für abhängige Stichproben bei nicht-normal verteilten Daten (Wilcoxon signed ranks test) untersucht. Ein P-Wert von weniger 0,05 wurde als signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

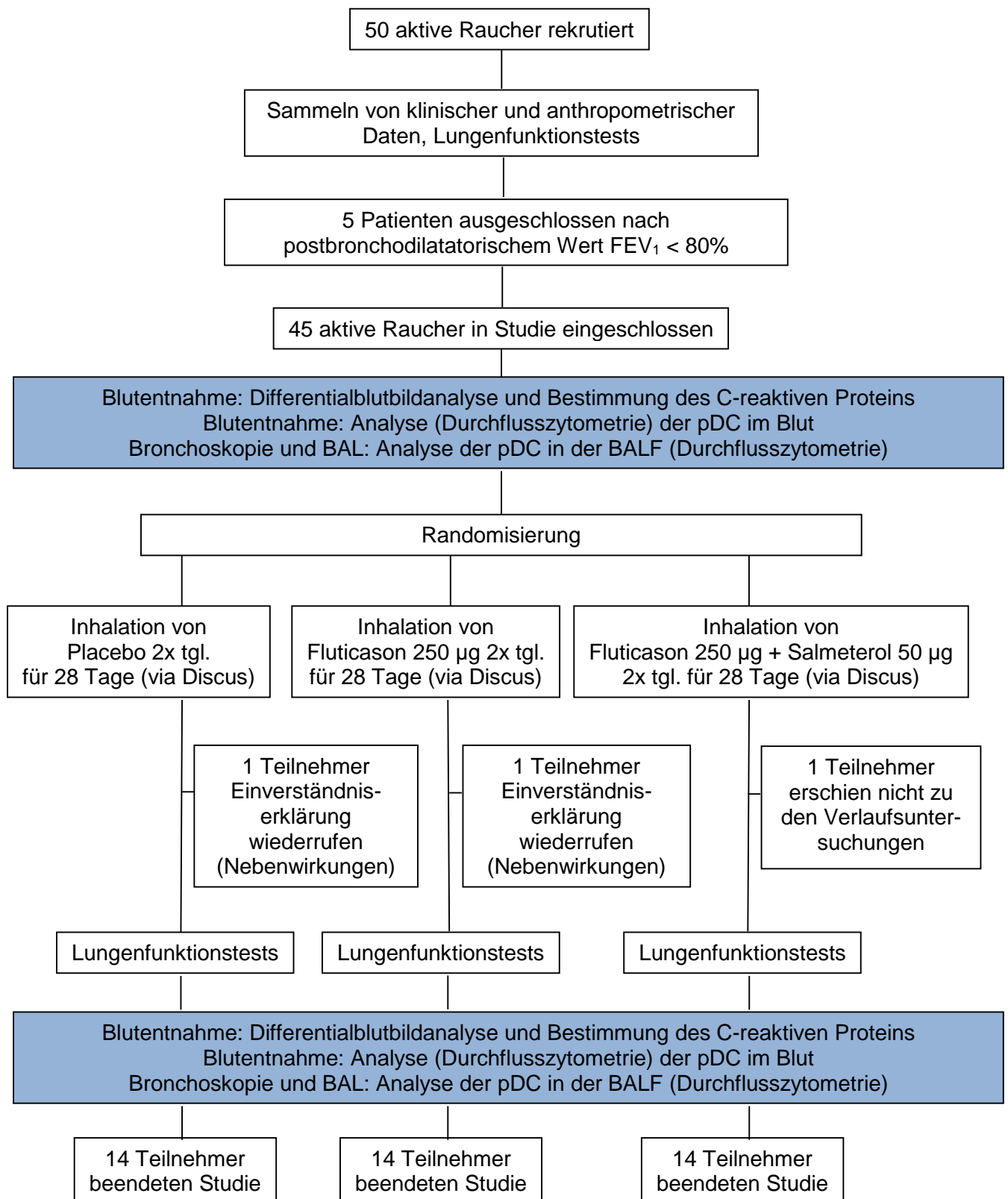
#### 3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Es wurden insgesamt 45 Raucher in die Studie zwischen dem Frühjahr 2009 und Herbst 2009 eingeschlossen. Die Probanden wurden durch den Biometriker Prof. Dr. Günther Kundt anhand der Randomisierungsliste in die drei Studienarme (Placebo, Fluticason oder Fluticason+Salmeterol) aufgeteilt.

Bezüglich Größe, Gewicht, Pack Years und gerauchten Zigaretten am Tag wiesen die untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf (Tab. 4). Auch bezüglich Blutdruck, Puls, Temperatur, Sauerstoffsättigung und Atemfrequenz fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Tab. 4). Bezüglich des Alters der Probanden gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Fluticason-Gruppe und Fluticason+Salmeterol-Gruppe ( $p=0,034$ ).

Analysen der Dosiszähler der Disci ergaben nach der 4-wöchigen Inhalationsperiode, dass Probanden einen Median von 55 (98%) der 56 Dosen inhaliert hatten, ohne signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

Fünf Studienteilnehmer nahmen regelmäßig Medikamente zur Senkung des Blutdruckes ein (Tab. 5). Jeweils ein Studienteilnehmer pro Gruppe vollendete die Studie nicht. Zwei Probanden brachen die Studie wegen Nebenwirkungen ab, ein Proband erschien nicht mehr zu den Verlaufsuntersuchungen.

**Abb. 18** Der Studienablauf.

	Parameter	Placebo	Fluticason	Fluticason+ Salmeterol
Allgemein	Anzahl der Probanden	14	14	14
	Alter (Jahre)	44 (30 – 61)	35 (30 - 55)	44 (34 - 60)
	Körpergröße (cm)	179 (166 – 188)	180 (168 – 190)	179 (164 – 183)
	Gewicht (kg)	76 (60 – 103)	83 (60 - 108)	79 (60 - 120)
	Pack-Years	30 (7,6 – 70)	23 (11,3 – 61,5)	25 (7,5 – 77,5)
	Zigaretten / Tag	17 (10 – 30)	19 (12 – 30)	17 (10 – 50)
	Zeitpunkt A	Blutdruck (mmHg)	130/90 (110/70 – 170/110)	140/90 (120/80 – 160/110)
		Puls (min <sup>-1</sup> )	73 (51 – 87)	70 (63 – 91)
		Temperatur (°C)	35,7 (34,7 – 36,4)	35,7 (34,9 – 36,4)
		Sauerstoffsättigung (%)	97,5 (96 – 99)	97,5 (96,0 – 100)
		Atemfrequenz (min <sup>-1</sup> )	14 (14 – 18)	16 (14 – 16)
	Zeitpunkt B	Blutdruck (mmHg)	130/90 (110/70 – 155/100)	135/90 (120/80 – 180/110)
		Puls (min <sup>-1</sup> )	71 (59 - 99)	70 (63 – 91)
		Temperatur (°C)	35,4 (34,8 – 36,0)	35,4 (34,0 – 36,2)
		Sauerstoffsättigung (%)	97 (94 – 99)	97 (96 – 100)
		Atemfrequenz (min <sup>-1</sup> )	15 (14 – 17)	15 (14 – 16)

**Tab. 4** Klinische und anamnestische Daten der Probanden: Median (Min.-Max.).

Nr.	Medikamente	Diagnosen	Auffälligkeiten
1	-	-	-
2	-	-	-
3	Hydrochlorothiazid/Ramipril, Bisoprolol fumarat/ Hydrochlorothiazid	Hypertonus	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	Große Tonsillen
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	Adipositas
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	Metoprolol succinat	Hypertonus	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	Adipositas
30	-	-	-
31	-	-	Adipositas
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	Exanthem an Füßen
39	-	-	-
40	Hydrochlorothiazid/Ramipril, Acetylsalicylsäure, Nisoldipin, Sulpirid	Hypertonus	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	Metoprolol succinat	Hypertonus	-
45	Bisoprolol hemifumarat	Hypertonus	-

**Tab. 5** Dauermedikation, Diagnosen und klinische Auffälligkeiten der Probanden.

### 3.2 Charakterisierung der Lungenfunktion

Tab. 6 stellt die Daten der Bodyplethysmographie dar. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen und keine signifikanten Veränderungen zwischen den Zeitpunkten A und B gefunden.

	Parameter	Placebo	Fluticason	Fluticason+ Salmeterol	
Lungen- funktion	Zeitpunkt A	VC IN (%/Soll)	96,8 (42,8 – 124)	99,7 (79,2 – 121,8)	91,2 (77,4 – 119,5)
		FVC (%/Soll)	103,3 (88,6 – 121,1)	97,7 (80,3 – 119,6)	97,1 (80,9 – 125,9)
		FEV <sub>1</sub> (%/Soll)	93,9 (82,3 – 110,3)	91 (80,2 – 123,6)	90 (80 – 120,5)
		FEV <sub>1</sub> / FVC (%)	74,1 (65 – 81,4)	79,9 (66,2 – 89,8)	76,1 (70,1 – 84,9)
		MEF 25 (%)	47,5 (26,3 – 97,3)	57,4 (16,1 – 137,9)	44,2 (29,3 – 102,3)
		RV (%/Soll)	113,2 (65,6 – 147,4)	87,8 (13,5 – 106,9)	92,5 (62,3 – 136,7)
		TLC (%/Soll)	103,9 (84,5 – 130,8)	95,4 (55,7 – 114)	95 (87,8 – 114,6)
		RV / TLC (%/Soll)	106,4 (74,9 – 119,9)	89,9 (58,3 – 116,9)	90,6 (59,3 – 125)
	Zeitpunkt B	VC IN (%/Soll)	98,3 (89,1 – 121,6)	95,7 (72,9 – 118,5)	94 (81,3 – 123,4)
		FVC (%/Soll)	100,3 (83,3 – 122,3)	99,3 (79,5 – 114,5)	96,7 (83,5 – 128,7)
		FEV <sub>1</sub> (%/Soll)	92,8 (71,7 – 107,1)	87,6 (80,7 – 116,6)	90,9 (81,6 – 123,5)
		FEV <sub>1</sub> / FVC (%)	74,2 (66,2 – 85)	77,7 (65,9 – 86,8)	76,5 (71,2 – 86,6)
		MEF 25 (%)	41,9 (15,9 – 92,8)	46,6 (11,9 – 122,9)	43,5 (33,1 – 128,1)
		RV (%/Soll)	107,5 (83,3 – 163,7)	95,4 (11,3 – 151,5)	93,8 (63,1 – 123,8)
		TLC (%/Soll)	98,1 (91,7 – 134)	99,8 (75,2 – 112,3)	97,5 (84,2 – 123,1)
		RV / TLC (%/Soll)	100,7 (78,9 – 121,6)	87,6 (68,7 – 128,3)	96 (55,8 – 114,4)

**Tab. 6** Lungenfunktion zu den Zeitpunkten A und B.

VC IN = inspiratorische Vitalkapazität, FVC = forcierte Vitalkapazität, FEV<sub>1</sub> = Menge an Luft, die in der ersten Sekunde bei forcierter Expiration ausgeatmet wird, FEV<sub>1</sub>/FVC= Tiffeneau-Index, MEF 25 = maximaler expiratorischer flow bei 25% der VC, RV = Residualvolumen, TLC = totale Lungenkapazität.

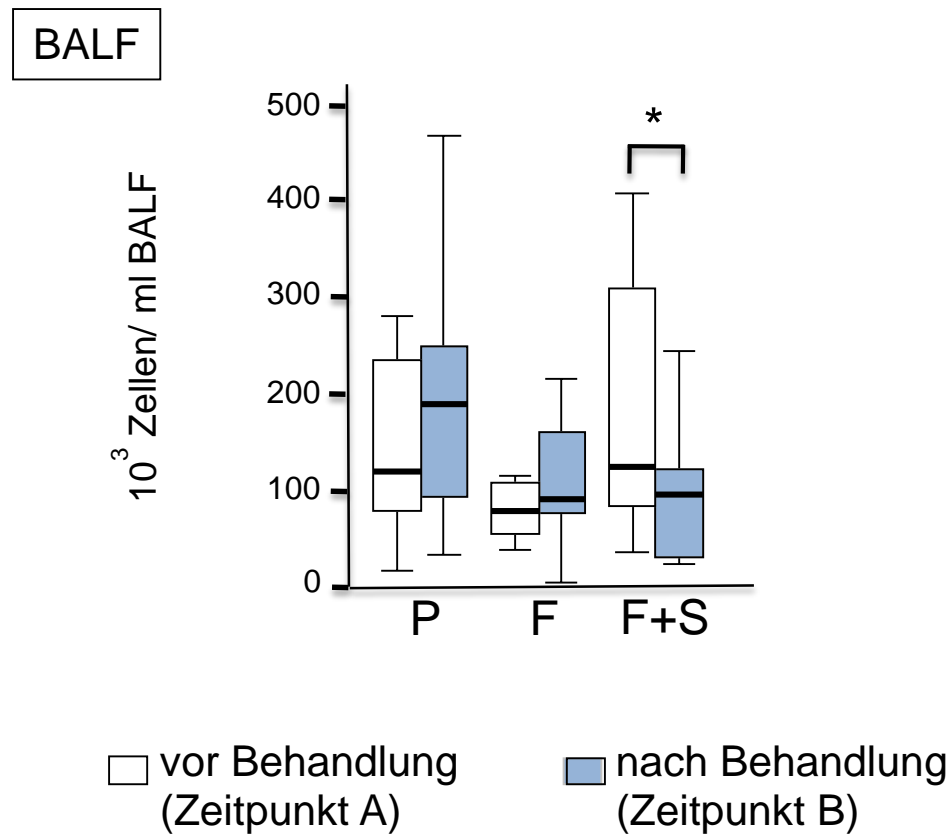


### 3.3 Leukozytendifferenzierung in der BALF

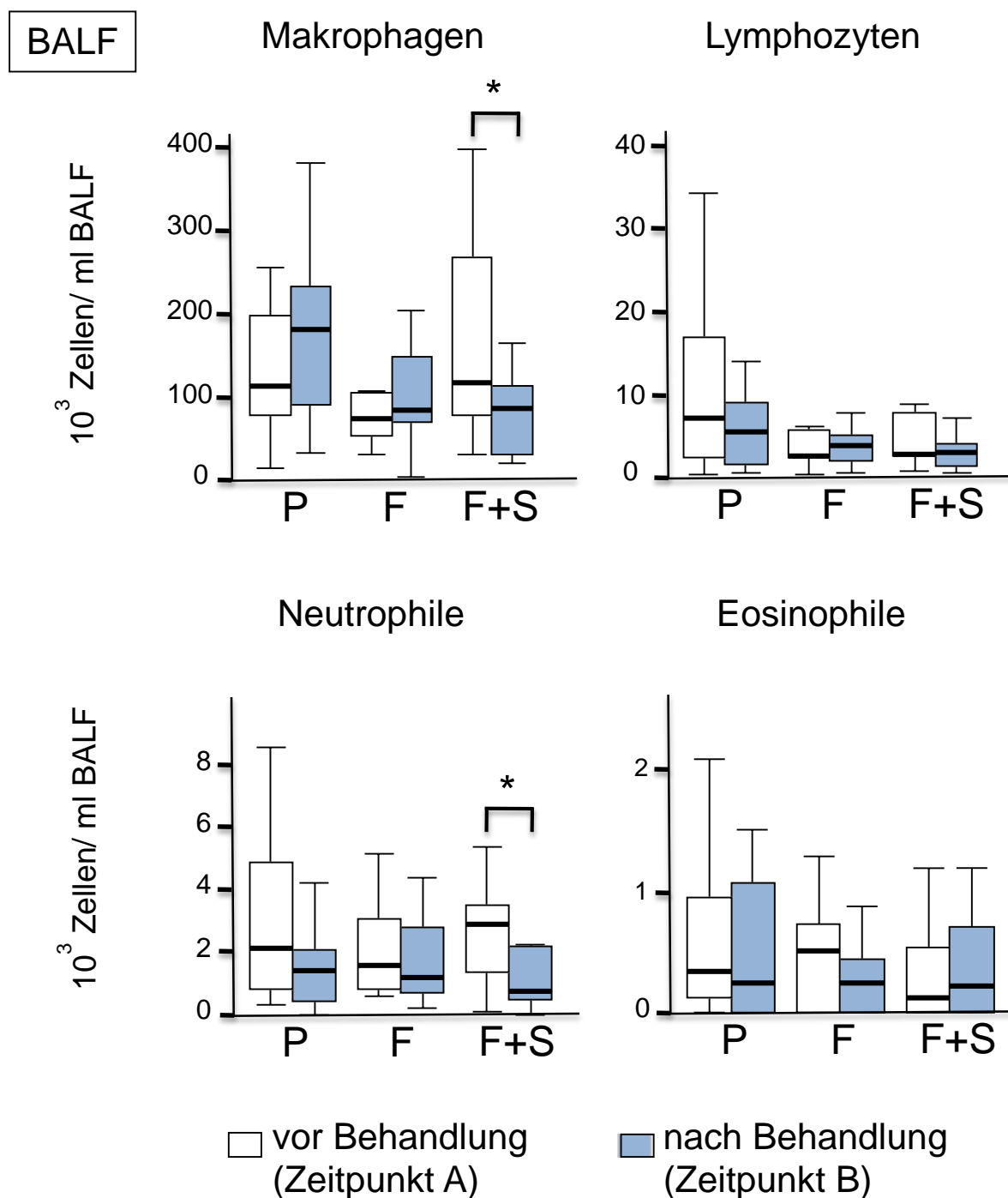
In Tab. 7 sind die erhobenen Daten aus der BALF dargestellt. Das Volumen der Proben (Recovery) hat sich nicht signifikant zwischen den drei Gruppen unterschieden. Die Anzahl der Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen hat sich in der BALF nach Behandlung in der Placebo- und Fluticason-Gruppe nicht signifikant verändert (Tab. 7). In der Fluticason+Salmeterol-Gruppe wurde ein signifikanter Abfall der Gesamtleukozytenzahl ( $p= 0,038$ ), der absoluten Anzahl an Makrophagen ( $p= 0,035$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $p= 0,022$ ) festgestellt (Abb. 19/Abb. 20; Tab. 7).

		Parameter	Placebo	Fluticason	Fluticason+Salmeterol
BALF	Zeitpunkt A	n	14	14	14
		Recovery (ml)	62 (45-67)	63 (56-70)	62 (55 - 65)
		Leukozyten (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	121 (17 - 487)	81 (38 - 284)	125 (36 - 409)
		Makrophagen (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	114 (15 - 447)	75 (32 - 263)	119 (32 - 397)
		Lymphozyten (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	7,2 (0,5 – 34,1)	2,7 (0,6 – 13,1)	3,0 (1,0 – 39,1)
		Neutrophile (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	2,1 (0,3 – 12,0)	1,6 (0,6 – 5,1)	2,9 (0,1 – 5,4)
		Eosinophile (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	0,4 (0,0 – 5,1)	0,5 (0,0 – 2,8)	0,1 (0,0 – 3,0)
	Zeitpunkt B	n	14	14	14
		Recovery (ml)	64 (48 - 71)	65 (37 - 72)	62 (54 - 70)
		Leukozyten (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	190 (35 - 469)	93 (6 - 217)	<b>97</b> <b>(25 - 339)*</b>
		Makrophagen (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	181 (34 - 459)	86 (5 - 205)	<b>88</b> <b>(22 - 315)*</b>
		Lymphozyten (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	5,6 (0,7 – 28,2)	4,1 (0,6 – 7,8)	3,2 (0,7 – 14,2)
		Neutrophile (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	1,4 (0,0 – 5,0)	1,2 (0,2 – 6,1)	<b>0,7</b> <b>(0,0 – 6,1)*</b>
		Eosinophile (10 <sup>3</sup> / ml BALF)	0,3 (0,0 – 4,2)	0,2 (0,0 – 1,2)	0,2 (0,0 – 3,4)

**Tab. 7** Charakteristika der gewonnenen BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) -Proben. Median (Min.-Max.) Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet.



**Abb. 19** Vergleich der Gesamtleukozytenzahlen in BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) vor und nach Behandlung. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.



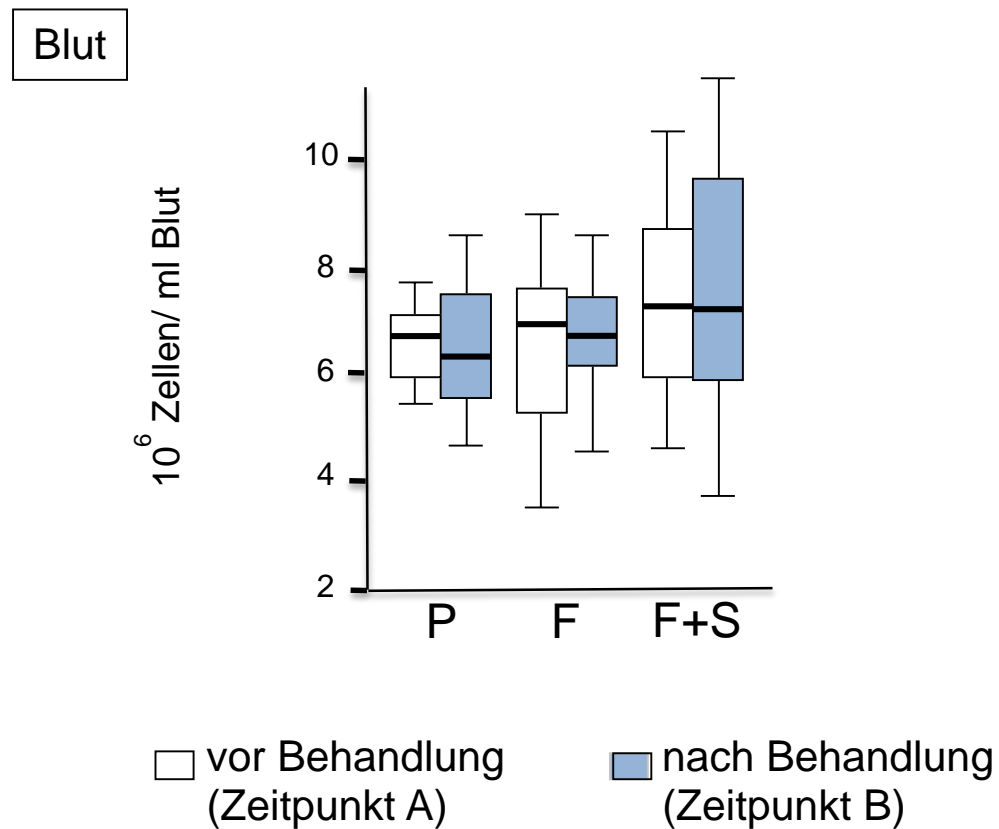
**Abb. 20** Vergleich der Differenzierung der Zellen in der BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) zwischen Zeitpunkt A und Zeitpunkt B zwischen den Gruppen. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

### 3.4 Blut-Parameter

Tab. 8 stellt die Blut-Parameter der Probanden an Zeitpunkten A und B dar. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zeitpunkten in den drei Gruppen festgestellt (Abb. 21/Abb. 22; Tab. 8).

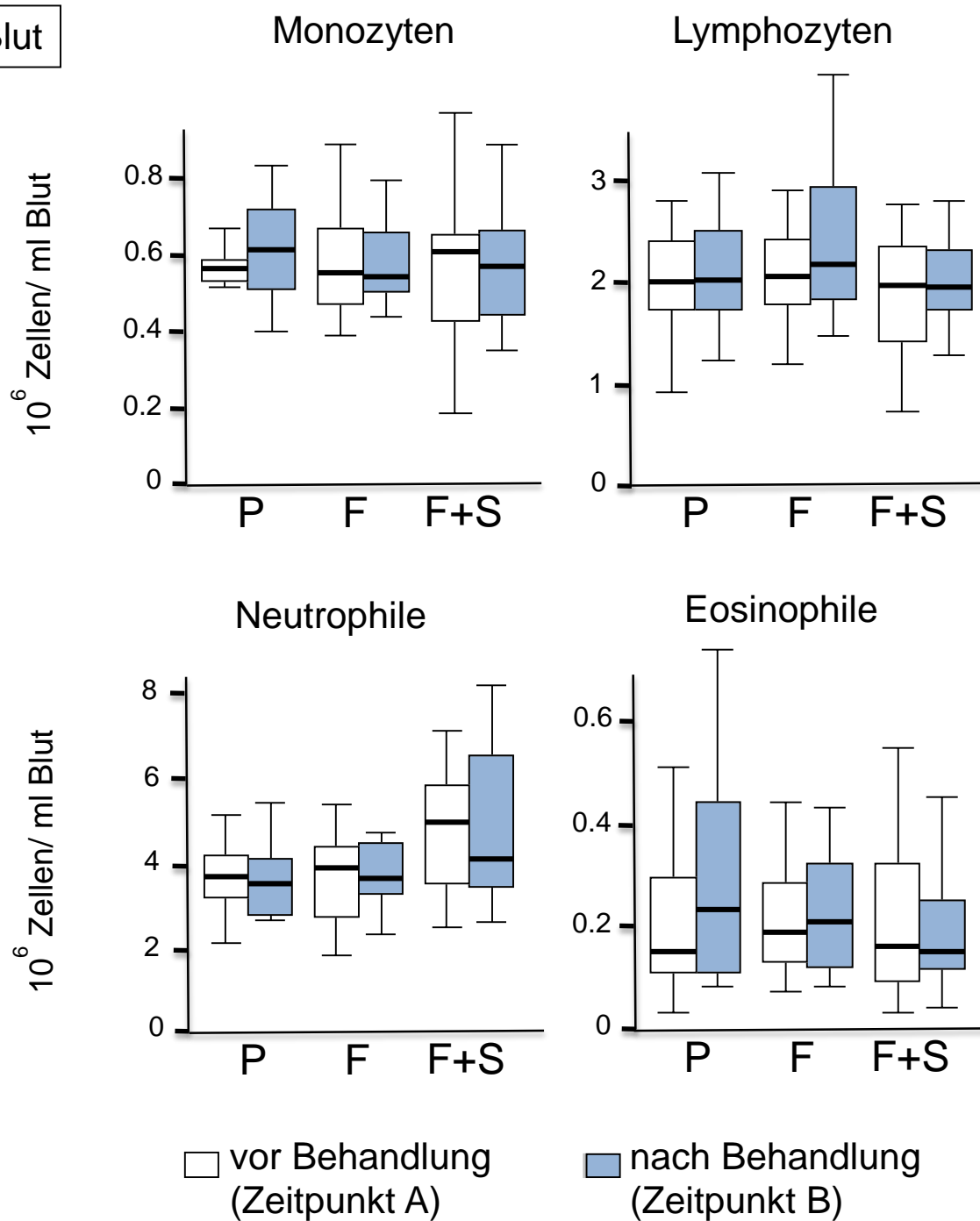
		Parameter	Placebo	Fluticason	Fluticason+Salmeterol
Blut	Zeitpunkt A	Hämoglobin (mmol/l)	9,1 (8 – 9,8)	9,5 (8,1 – 10,5)	9,4 (8,5 – 10,8)
		Thrombozyten (10 <sup>6</sup> /ml)	234 (146 – 338)	211 (176 – 391)	204 (142 – 320)
		Leukozyten (10 <sup>6</sup> /ml)	6,7 (5,4 – 9,8)	7 (3,5 – 9)	7,2 (4,6 – 13,1)
		Monozyten (% der Leukozyten)	8,9 (6 – 10,6)	9,2 (6,4 – 13)	7,2 (4 – 12,4)
		Lymphozyten (%)	32,7 (16,6 – 47,5)	32,9 (23,3 – 40,4)	24,9 (10,3 – 37,2)
		Neutrophile (%)	56,6 (39,1 – 72,6)	54,7 (47,1 – 65,2)	64 (6 – 81,1)
		Eosinophile (%)	2,2 (0,4 – 11)	3,2 (1,3 – 4,9)	2,35 (0,4 – 7,4)
		CRP (mg/l)	1,3 (1 – 12,3)	2 (1 – 9,4)	2 (1–7,58)
		Natrium (mmol/l)	139 (136 – 142)	139 (135 – 142)	141 (134 – 144)
		Kalium (mmol/l)	3,9 (3,2 – 5,5)	3,9 (3,5 – 4,2)	3,9 (4,3 – 4,2)
	Zeitpunkt B	Hämoglobin (mmol/l)	9,1 (8,6 – 9,9)	9,3 (5,4 – 10,5)	9,3 (8,6 – 10,2)
		Thrombozyten (10 <sup>6</sup> /ml)	238 (157 – 341)	218 (178 – 312)	216 (147 – 341)
		Leukozyten (10 <sup>6</sup> /ml)	6,3 (4,7 – 13,9)	6,7 (4,6 – 16,1)	7,2 (3,74 – 11,5)
		Monozyten (%)	8,9 (6 – 14)	8,3 (6,2 – 13,8)	7,7 (5 – 11)
		Lymphozyten (%)	29,1 (22 – 44,1)	33,3 (25 – 39,7)	27,6 (15 – 38,6)
		Neutrophile (%)	54,8 (41,9 – 69)	54,5 (46,3 – 62)	61,8 (47,8 – 71)
		Eosinophile (%)	2,9 (1,1 – 9,9)	2,8 (1,1 – 6,3)	2 (0,9 – 6,2)
		CRP (mg/l)	1,6 (1 – 5,3)	2 (1 – 9,5)	1 (1–11,9)
		Natrium (mmol/l)	140 (136 – 145)	139 (136 – 141)	138,5 (134 – 141)
		Kalium (mmol/l)	3,9 (3,4 – 4,3)	4 (3,6 – 4,5)	3,9 (3,4 – 4,9)

**Tab. 8** Charakteristika der gewonnen Blutproben. CRP = C-reaktives Protein.



**Abb. 21** Gesamtleukozyten an den Zeitpunkten A und B im Blut. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

Blut



**Abb. 22** Anzahl der Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile im Blut an den Zeitpunkten A und B zwischen den Gruppe. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

### **3.5 Anzahl der pDC in der BALF und im Blut**

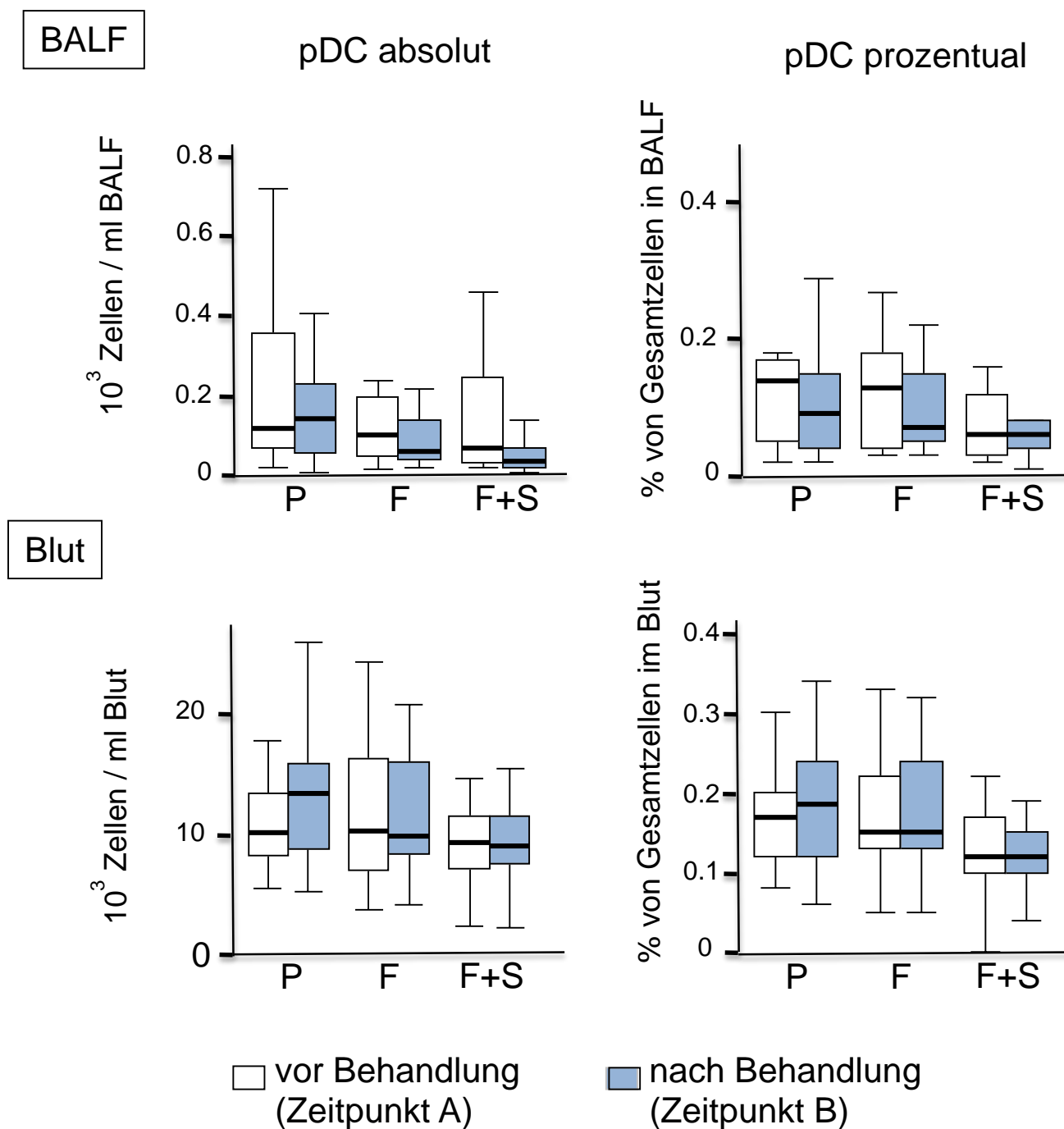
Tab. 9 stellt die quantitative Veränderung der pDC zwischen Zeitpunkten A und B dar. Es wurde kein signifikanter Unterschied der Anzahl der pDC in den Gruppen zwischen Zeitpunkten A und B festgestellt, sowohl in der BALF als auch im Blut (Abb. 23).

Vergleicht man die Placebo-Gruppe mit beiden Fluticason-Gruppen zusammen, ergibt sich eine signifikante Reduktion der pDC in der BALF ( $p=0,049$ ) (Tab. 9, Abb. 24) unter Fluticason-Therapie.

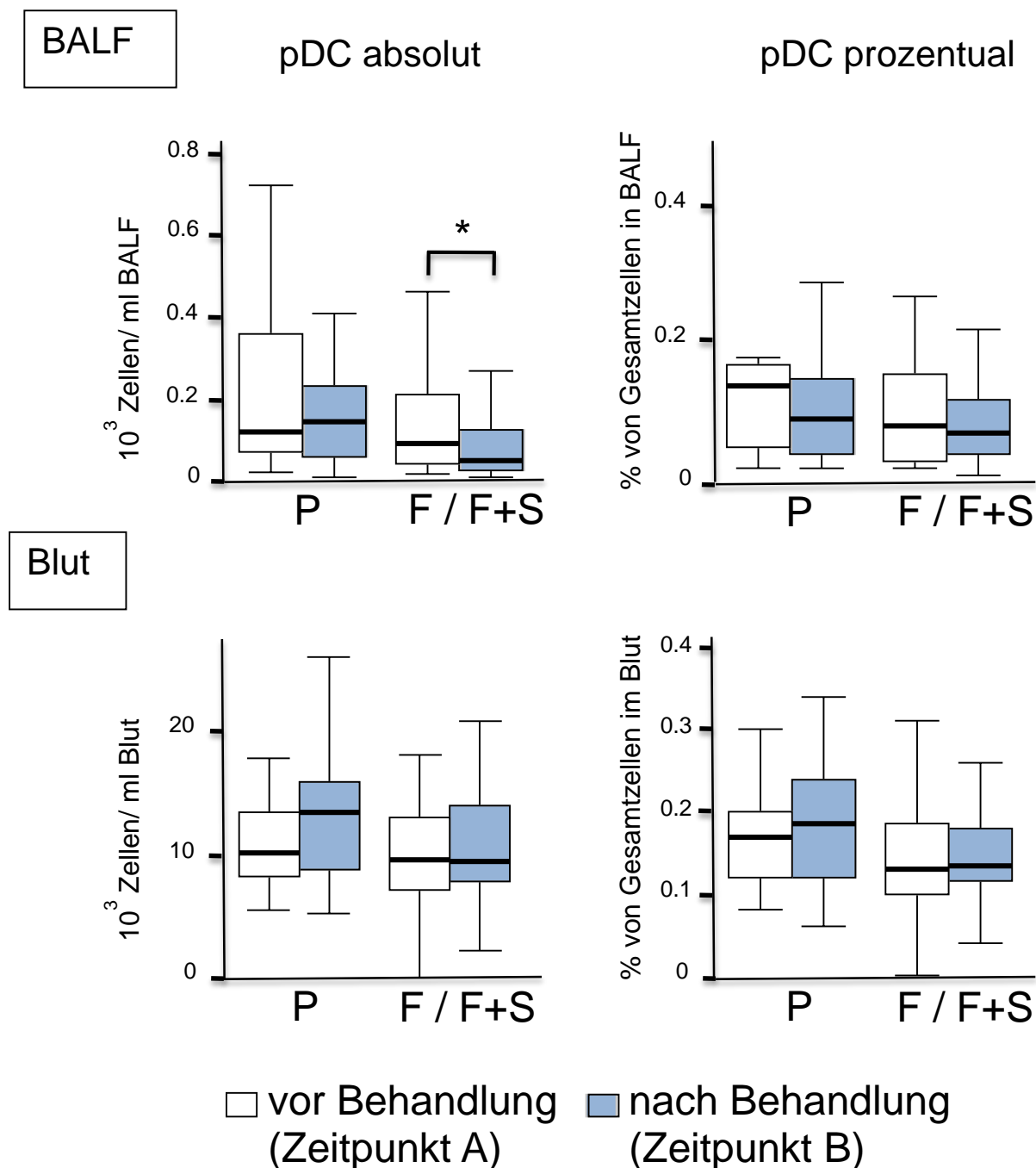


	Parameter		Placebo	Fluticason	Fluticason+Salmeterol	Fluticason und Fluticason+Salmeterol
BALF	Zeitpunkt A	pDC (10 <sup>3</sup> /ml)	12 (2-72)	10,5 (2-24)	7 (2-59)	9 (2-59)
		pDC %	14 (2-69)	13 (3-51)	6 (2-43)	8 (2-51)
	Zeitpunkt B	pDC (10 <sup>3</sup> /ml)	14,5 (1-77)	6,5 (2-22)	4 (1-68)	<b>5 (1-68)*</b>
		pDC %	9 (2-36)	7 (3-34)	6 (1-30)	7 (1-34)

**Tab. 9** pDC in der BALF an den Zeitpunkten A und B. Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten ist mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet.



**Abb. 23** Anzahl der pDC in der BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) und Blut in den Gruppen an den Zeitpunkten A und B. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.



**Abb. 24** Anzahl der pDC in der BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) und Blut in der Placebo-Gruppe und der gemeinsamen Gruppe aller Fluticason behandelten Probanden (F/F+S), an den Zeitpunkten A und B. Signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ist mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

### 3.6 Oberflächenmarker auf den pDC

Tab. 10 zeigt die Expression der Oberflächenmarker an den Zeitpunkten A und B. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Expression der Oberflächenmarker zwischen den Zeitpunkten A und B in den verschiedenen Gruppen gefunden.

		Parameter	Placebo	Fluticason	Fluticason+Salmeterol
Ober- Flächen- Marker	Zeitpunkt A	n	14	14	14
		BDCA-3 [%]	93 (83 - 100)	93 (86 - 97)	93 (81 - 100)
		CCR5 [%]	89 (10 - 98)	76 (39 - 99)	89 (43 - 97)
		CXCR3 [MFI]	241 (194 - 458)	282 (215 - 503)	305 (160 - 369)
		CXCR4 [MFI]	1185 (652 - 1536)	1224 (1076 - 1372)	1294 (820 - 1757)
	Zeitpunkt B	n	14	14	14
		BDCA-3 [%]	94 (89 - 100)	94 (88 - 98)	93 (91 - 97)
		CCR5 [%]	91 (45 - 98)	85 (56 - 98)	78 (34 - 98)
		CXCR3 [MFI]	310 (194 - 413)	295 (190 - 452)	277 (199 - 324)
		CXCR4 [MFI]	1164 (720 - 1303)	1309 (1052 - 1483)	1366 (969 - 1828)

**Tab. 10** Oberflächenmarker auf pDC. MFI: Median Fluorescence Intensity

## 4. Diskussion

PDC spielen eine zentrale Rolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem <sup>30, 63</sup>. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals den Einfluss von ICS auf die pDC in humanen Atemwegen von Rauchern *in vivo*. Die Ergebnisse der Arbeit liefern einen Beitrag zur Forschung auf dem Gebiet des Pathomechanismus von Exazerbationen und Pneumonien unter ICS-Therapie von Rauchern.

### 4.1 Methodische Stärken und Schwächen

#### 4.1.1 Stärken der Arbeit

Die vorliegende Studie hat mehrere methodische Stärken:

- 1) Es handelte sich um eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie. Somit wurde ein wissenschaftlich hochwertiges Design gewählt.
- 2) Eine weitere methodische Stärke der Studie ist die gut validierte Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung der pDC in der BALF (2.11) <sup>25,64</sup>.
- 3) Tiermodelle weisen sowohl bezüglich der Lungen-Anatomie als auch der Immunologie deutliche Unterschiede zu Menschen auf. Daher sind Tiermodelle von Lungenerkrankungen nur eingeschränkt mit der Situation in Menschen vergleichbar <sup>65, 66</sup>. Eine Stärke dieser Studie ist daher, dass Material aus humanen Atemwegen untersucht wurde.
- 4) Es wurden in dieser Studie nur Männer rekrutiert, um den Einfluss von Unterschieden im Hormonhaushalt zwischen Männern und Frauen zu minimieren, die das Immunsystem beeinflussen könnten <sup>67</sup>.

#### 4.1.2 Schwächen der Arbeit

Die Schwächen sind folgendermaßen zu beschreiben:

- 1) Es wurden nur endoluminale pDC aus der BALF untersucht, obwohl der Großteil der DC sich in der Submucosa der Atemwege befindet (1.3). Der Einfluss auf pDC in der Mucosa konnte daher nicht charakterisiert werden <sup>15</sup>.
- 2) Die Zeitspanne der Einnahme der Medikamente (4 Wochen) war relativ

kurz. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einer Therapie über einen längeren Zeitraum (z.B. 1 Jahr) andere Effekte (z.B. auf die Oberflächenmarker) zu sehen wären.

3) Es wurden nur Raucher mit normaler Lungenfunktion in die Studie eingeschlossen. Aussagekräftiger wäre es gewesen, Patienten mit einer COPD zu untersuchen. Dies war auch der initiale Plan für diese Studie. Die Ethikkommission in Rostock lehnte jedoch eine Placebo-Behandlung von Patienten mit COPD (auch in leichteren Stadien) grundsätzlich ab. Da wir jedoch eine Placebo-Gruppe als unerlässlich für die Beurteilung der Wirkung ansahen, wurde die Entscheidung getroffen, Raucher mit normaler Lungenfunktion zu untersuchen.

4) Es fehlte ein Studienarm mit alleiniger Salmeterol-Therapie. Zum Zeitpunkt der Studie standen jedoch seitens des Herstellers (GlaxoSmithKline KG Co. GmbH) keine verblindbaren Salmeterol-Disci für die Studienzwecke bereit, daher musste auf diese Gruppe verzichtet werden.

## **4.2 Gesamtleukozyten in BALF und Blut**

Die vorliegende Arbeit untersuchte verschiedene Zellpopulationen in der BALF und im Blut von den Probanden aus dieser Studie. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der Gesamtleukozyten, sowie der Makrophagen und Neutrophilen unter der Behandlung der Kombination von Fluticason/Salmeterol (nicht jedoch Fluticason allein) im Vergleich zu Placebo.

Makrophagen dienen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems und phagozytieren Krankheitserreger. In anderen Arbeiten wurde bisher die Wirkung von 4-wöchiger ICS/LABA-Therapie auf Makrophagen bei Rauchern in der BALF noch nicht untersucht. Molekulare Modifikationen *in vitro* wurden aber gezeigt <sup>68</sup>. Donnelly et al. postulierten, dass das LABA Formoterol die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen inhibieren würde und additiv mit Budesonid agieren könnte. Außerdem zeigte eine ICS/LABA-Behandlung von humanen Monozyten *in vitro* eine verringerte IL-8 Produktion (chemotaktischer Botenstoff für Neutrophile) nach Rauchexposition <sup>69</sup>. Diese Daten könnten auf anderer Ebene eine gegenseitige Verstärkung antiinflammatorischer Wirkungen

zwischen ICS und LABA erklären <sup>70</sup>. Unsere Beobachtung, dass nur die Kombinationstherapie (nicht jedoch ICS allein) die Makrophagen in den Atemwegen senken, bestätigt diese Studien erstmals *in vivo* an Menschen. In einer Studie von Barnes et al. war in den Lungenbiopsien von Rauchern und Ex-Rauchern allerdings kein Effekt der Kombinationstherapie Fluticason/Salmeterol auf die Makrophagen gefunden wurden <sup>71</sup>.

Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen. Ihre Hauptaufgaben sind die Isolierung, Einschließung und Tötung von Pathogenen mittels oxidativer und nicht-oxidativer Mechanismen <sup>72</sup>. In der vorliegenden Studie waren neutrophile Granulozyten nach Behandlung mit der Kombinationstherapie Fluticason/Salmeterol in der BALF reduziert, nicht aber unter Monotherapie mit Fluticason. In der Studie von Barnes et al. wurde bei Patienten mit COPD eine Reduktion der Neutrophilen im Sputum unter 13-wöchiger ICS/LABA-Therapie gezeigt <sup>71</sup>. Unsere Daten bestätigten diese Studie zu Neutrophilen in den Atemwegen von Rauchern. Eine Reduktion der Neutrophilen in den Atemwegen von Rauchern und Patienten mit COPD unter ICS-Therapie könnte zu einer erhöhten Infektanfälligkeit der Patienten beitragen.

### **4.3 Einfluss der ICS auf die pDC in den Atemwegen**

Diese Studie zeigt zum ersten Mal die Reduktion der pDC bei Behandlung mit inhalativen Steroiden in der BALF von Rauchern. Bei der kombinierten Auswertung aller ICS-behandelten Raucher zeigte sich eine signifikante pDC-Reduktion im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Der Trend zur pDC-Reduktion in den ICS-Einzelgruppen war identisch. Somit schlussfolgern wir, dass ICS unabhängig von einer LABA-Ko-Medikation die pDC in den Atemwegen der Raucher reduzieren. Im Gegensatz dazu führte die Therapie mit Fluticason allein oder der Kombination Fluticason/Salmeterol zu keiner Änderung der Oberflächenmarker. Wir vermuten daher, dass eine ICS-Therapie keine speziellen Funktionsänderungen der pDCs auslöst, sondern vielmehr zu einer unspezifischen pDC-Senkung (z.B. durch Apoptose-Induktion) führt.

Plasmazytoide dendritische Zellen spielen eine integrale Rolle bei der Immunabwehr, sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven

Immunabwehr<sup>30</sup>. Sie können im Rahmen der angeborenen Immunantwort Typ-I-Interferon produzieren und damit eine Kaskade an antiviralen Maßnahmen in dem infizierten Wirt auslösen<sup>31</sup>. Typ-I-Interferon aktiviert und modifiziert Signalwege, die Nachbarzellen vor der Infektgefahr warnen oder Apoptose in virus-infizierte Zellen induzieren<sup>32</sup>. Bei der adaptiven Immunität erkennen sie als wichtige APC Antigene welches zur Aktivierung und Proliferation spezifischer T- und B-Lymphozyten, der Bildung humoraler Abwehrstoffe, und die Bildung von Memory-Zellen führt.

PDC sind sehr sensibel gegenüber Steroiden. Prednisolon oder auch Dexamethason inhibieren die Differenzierung von pDC und induzieren Apoptose in humanen pDC<sup>73, 74</sup>. Lommatzsch et al. haben 2007 anhand der Daten einer Pilotstudie schon vermutet, dass die steroid-induzierte Reduktion von endobronchialen pDC mit einem Anstieg der Pneumonierate zusammenhängen könnte<sup>59</sup>.

Mit dieser prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie haben wir erstmals zeigen können, dass ICS unabhängig von LABA die pDC in den Atemwegen von Rauchern reduzieren und somit einen Einfluss auf die Infektabwehr haben könnten.

#### 4.4 Rolle der ICS in der COPD-Therapie

Aktuell wird die Rolle von ICS in der COPD-Therapie sehr kritisch diskutiert. Der Hauptgrund des Einsatzes von ICS war bislang die Senkung der Exacerbationsrate bei COPD. Dieses Konzept beruhte auf diversen Studien, welche den Effekt der Therapie mit ICS in Kombination mit LABA auf Morbidität und Exacerbationsrate untersuchten.

Am bekanntesten ist die 2007 publizierte **TORCH** (**T**owards a **R**evolution in **C**OPD **H**ealth) Studie, welche zeigte, dass die Therapie mit Salmeterol/Fluticason bei der COPD zu einer signifikanten Reduktion der Exacerbationsrate führte, im Vergleich mit Placebo. Bereits in der **TORCH**-Studie wurde jedoch festgestellt, dass die Therapie mit Fluticason (in der Einzel- oder Kombinationstherapie) mit einer signifikant höheren Pneumonierate assoziiert war<sup>75</sup>.

Die Daten der **TORCH**-Studie wurden in nachfolgenden Studien mit anderen ICS bestätigt. So zeigten kürzlich Dransfield et al., dass die



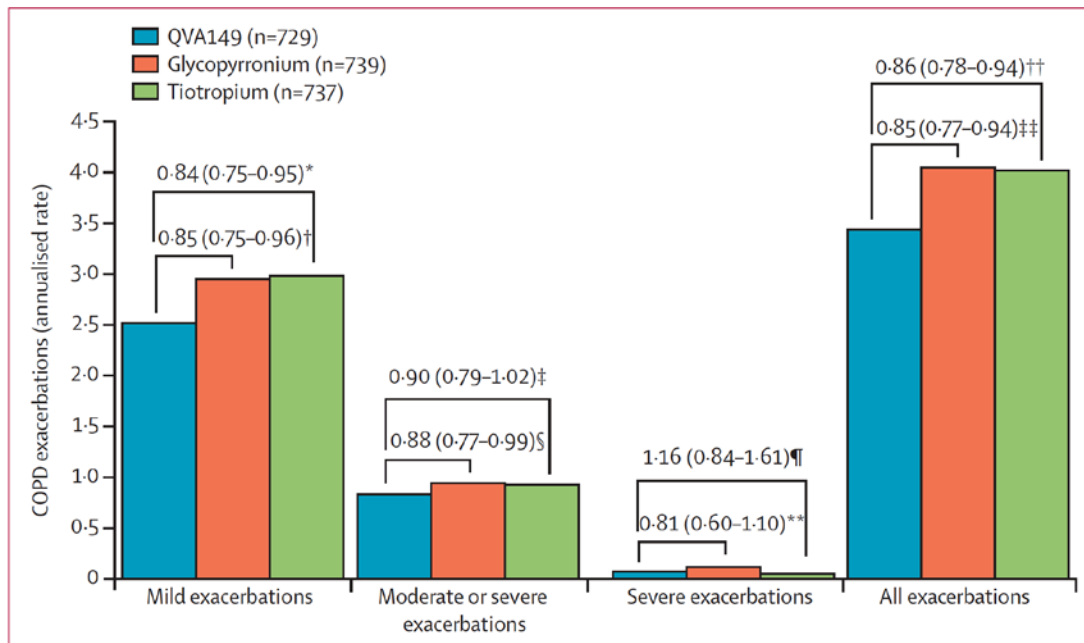
Kombination aus dem LABA Vilanterol und dem ICS Fluticasonfuroat zu einer Reduktion der COPD-Exacerbation im Vergleich zur LABA-Monotherapie führt, bei gleichzeitiger Zunahme des Pneumonie-Risikos <sup>52</sup>. Es konnte durch Dransfield et al. sogar die Dosisabhängigkeit der Pneumonie-Induktion durch ICS gezeigt werden. Dransfield et al. schlussfolgerten jedoch, dass die LABA/ICS-Therapie bei der COPD weiterhin ihre Berechtigung habe, da die Senkung der Exacerbationsrate deutlich ausgeprägter sei als die Steigerung des Pneumonie-Risikos <sup>52</sup>.

Parallel zum Postulat, dass die ICS die COPD-Exacerbationsrate senken, wurden jedoch mehrere Studien publiziert, die eine Senkung der Exacerbationsrate durch langwirksame Parasympathikolytika (LAMA) und langwirksame Sympathikomimetika (LABA) zeigten.

Die **UPLIFT** (**U**nderstanding **P**otential **L**ong **T**erm **I**mpacts on **F**unction with **T**iotropium) Studie 2008 zeigte eine Reduktion der Exacerbationen sowie eine Verbesserung der Lungenfunktion und Lebensqualität unter einer Therapie mit dem LAMA Tiotropium <sup>76</sup>. Die **TORCH**-Studie hatte bereits gezeigt, dass LABA allein die Exacerbationsrate senken <sup>75</sup>.

Beide Studien zeigten übereinstimmend, dass LAMA die Exacerbationsrate stärker als LABA senken. In der **POET**-Studie (**P**revention **o**f **E**xacerbations with **T**iotropium) aus dem Jahre 2011 wurde das LABA Salmeterol und in der **INVIGORATE**-Studie (indacaterol: providing opportunity to reengage patients with life) aus dem Jahre 2013 das LABA Indacaterol jeweils mit Tiotropium verglichen <sup>77, 78</sup>.

Die **SPARK**-Studie aus dem Jahre 2013 verglich die Kombinationstherapie LABA/LAMA (Indacaterol/Glycopyrronium) mit der LAMA-Monotherapie (Glycopyrronium oder Tiotropium). Es wurde gezeigt, dass die Kombinationstherapie LABA/LAMA milde Exacerbationen besser senken konnte als die LAMA-Monotherapien. Der Effekt auf moderate bis schwere Exacerbationen war jedoch mit den LAMA-Monotherapien vergleichbar, so dass in der Tat davon ausgegangen wird, dass die LAMA-Komponente der Haupt-Treiber der Senkung der Exacerbationsrate sind <sup>79</sup> (Abb. 25).



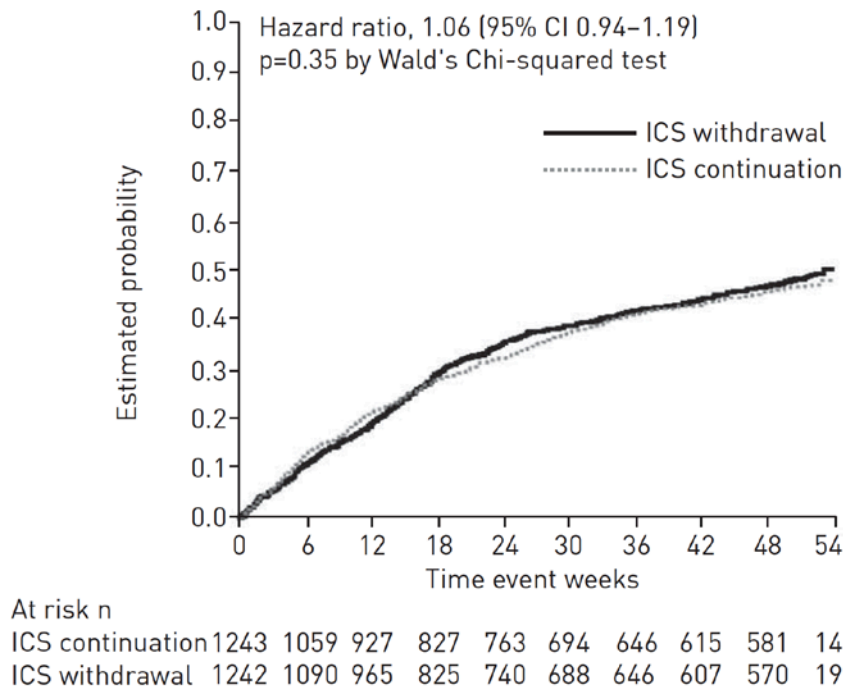
**Figure 2: Annualised rate of COPD exacerbations, by treatment group**

Values are rate reduction (95% CI; p value). \*p=0.0052. †p=0.0072. ‡p=0.096. §p=0.038. ¶p=0.36. \*\*p=0.18.

††p=0.0017. ‡‡p=0.0012.

**Abb. 25** Daten zur Exacerbationsrate der **SPARK** Studie <sup>79</sup>, QVA149 = Kombinationstherapie Indacaterol/Glycopyrronium

Aus den LAMA/LABA-Daten ergab sich die Frage, inwiefern der ICS-Effekt auf die Exacerbationsrate Bestand hat, wenn bereits eine LAMA/LABA-Therapie (welche die Exacerbationsrate für sich gesehen schon senkt) besteht. Dies wurde erstmals in der **WISDOM**-Studie 2014 (**Withdrawal of Inhaled Steroids during Optimized Bronchodilator Management**) untersucht. In der **WISDOM**-Studie wurden COPD-Patienten für 6 Wochen lang mit einer Dreifach-Therapie aus LABA (Salmeterol), LAMA (Tiotropium) und ICS (Fluticason) behandelt. Danach wurde in der Hälfte der Patienten die ICS-Therapie fortgeführt, in der anderen Hälfte der Patienten beendet. Zwischen beiden Therapie-Armen fand sich kein Unterschied in der Exacerbationsrate (Abb. 26). Somit stellte die **WISDOM**-Studie die Frage, in wieweit eine ICS-Zusatz-Therapie bei bereits vorhandener LABA/LAMA-Therapie überhaupt Sinn macht, da ICS die Exacerbationsrate nicht weiter senken, sondern mit einer erhöhten Pneumonierate einhergehen <sup>80, 81, 52</sup>. Eine ICS-Therapie scheint daher bei bereits etablierter dualer Bronchodilatation möglicherweise nicht sinnvoll zu sein.



**Abb. 26** Wahrscheinlichkeit von Exacerbationen unter LAMA/LAMA/ICS-Therapie („ICS continuation“) oder LAMA/LABA-Therapie („ICS withdrawal“) Adaptiert nach <sup>82</sup>

Andere Autoren argumentieren hingegen, dass eine pauschale Ablehnung einer ICS-Therapie bei COPD-Patienten nicht gerechtfertigt sei. Vielmehr werden Biomarker gefordert (wie z.B. die Eosinophilenverteilung im Sputum oder Blut), die eine Identifizierung der COPD-Patienten ermöglichen, die bezüglich der Exacerbationsrate von einer ICS-Therapie profitieren <sup>83, 84</sup>.

Inwieweit diese „ICS-sensible“ COPD-Subpopulation jedoch vom Pneumonie-Risiko verschont ist, bleibt aktuell noch unklar. In der aktuellen Studie von Pascoe et al. zeigte sich ein konstantes Pneumonie-Risiko in allen Subpopulationen. Somit bleibt das Pneumonie-Risiko eines der Hauptargumente gegen eine ICS-Therapie bei der COPD.

## 4.5 Schlussfolgerung

Die Rolle der pDC in der Infektabwehr ist ein aktuell viel diskutiertes Forschungsgebiet. Unsere prospektive, randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie liefert erstmals eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Pneumonierate unter ICS-Therapie: wir konnten zeigen, dass es bei Rauchern zu einer Reduktion der pDC in den Atemwegen kommt <sup>85</sup>. Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Mechanismen der pDC-Reduktion und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Patienten mit COPD zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind bedeutende Akteure im angeborenem und adaptivem Immunsystem. Plasmazytoide DC (pDC) fungieren als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem als Antigen-präsentierende Zellen und sind an der Abwehr u.a. gegen Viren beteiligt. Sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunantwort spielt eine wichtige Rolle bei rauch-assoziierten Lungenerkrankungen.

Die Rolle der pDC bei rauch-assoziierten Lungenerkrankungen ist bis heute jedoch weitgehend unbekannt. Insbesondere fehlen grundlegende Daten zur Beeinflussung der pDC in den Atemwegen von Rauchern durch inhalative Medikamente.

In der vorliegenden prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie wurden 45 Raucher über einen Zeitraum von 28 Tagen entweder mit Placebo (P), Fluticason (F) oder Fluticason+Salmeterol (F+S) inhalativ behandelt. Am Tag 0 und Tag 28 wurden Blutproben und eine bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit gewonnen. Die pDC und deren Oberflächenmarker wurden mit einer etablierten durchflusszytometrischen Methode der Abt. für Pneumologie der Universität Rostock gemessen.

Es zeigte sich, dass es nur unter einer Kombinations-Therapie aus ICS (Fluticason) und LABA (Salmeterol), nicht jedoch unter einer ICS-Monotherapie, zu einer signifikanten Reduktion neutrophiler Granulozyten und Makrophagen in den Atemwegen von Rauchern kommt.

Die Reduktion der pDC in den Atemwegen war hingegen unabhängig von einer begleitenden LABA-Therapie. Die Oberflächenmarkerexpression der pDC wurde durch die verschiedenen Therapien nicht beeinflusst. Somit liefert die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse zur Regulation der pDC in den Atemwegen unter ICS-Therapie. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass eine ICS-Therapie durch eine Verminderung der pDC in den Atemwegen das Pneumonie-Risiko bei Rauchern steigert. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle der pDC bei Patienten mit rauch-assoziierten Lungenerkrankungen besser zu verstehen.

## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Meyers R. Immunology. From Cell Biology to Disease. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007.
2. Moreira AP, Hogaboam CM. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:485-91.
3. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003;81:289-96.
4. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. England 2011;519-31.
5. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;175:1373-81.
6. Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG. Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med* 1991;173:1345-56.
7. Nicod L. Lung defenses: an overview. *European Respiratory Review* 2005:45-50.
8. Schürch S, Gehr P, Im Hof V, Geiser M, Green F. Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli. *Respir Physiol* 1990;80:17-32.
9. Harada RN, Repine JE. Pulmonary host defense mechanisms. *Chest* 1985;87:247-52.
10. Lehnert BE. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environ Health Perspect* 1992;97:17-46.

11. Godfrey RW. Human airway epithelial tight junctions. *Microsc Res Tech* 1997;38:488-99.
12. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194:863-9.
13. Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S151-6.
14. Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med* 1980;37:337-62.
15. Blank F, Rothen-Rutishauser B, Gehr P. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:669-77.
16. Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, Goel D, O'Brien E, Mancuso P. Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2010;78:1214-20.
17. Bratke K, Klug M, Bier A, et al. Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:655-60.
18. Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* 1998;83:148-56.
19. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006;6:476-83.
20. Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2003;3:994-1003.
21. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000;12:71-81.
22. Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Saeland S. Langerin/CD207 sheds light on formation of birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol Res* 2003;28:93-107.
23. Sholl LM, Hornick JL, Pinkus JL, Pinkus GS, Padera RF. Immunohistochemical analysis of langerin in langerhans cell histiocytosis and

pulmonary inflammatory and infectious diseases. *Am J Surg Pathol* 2007;31:947-52.

24. Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:177-84.

25. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, et al. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 2007;62:168-75.

26. Nishikawa Y, Sato H, Oka T, Yoshino T, Takahashi K. Immunohistochemical discrimination of plasmacytoid dendritic cells from myeloid dendritic cells in human pathological tissues. *J Clin Exp Hematop* 2009;49:23-31.

27. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-26.

28. Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol* 2010;87:609-20.

29. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:530-51.

30. McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol. United States* 2005:17-27.

31. Esashi E, Watowich SS. Dendritic cells: transcriptional control of plasmacytoid dendritic cell development by E2-2. *Immunol Cell Biol* 2009;87:1-2.

32. Swiecki M, Wang Y, Vermi W, Gilfillan S, Schreiber RD, Colonna M. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* 2011;208:2367-74.

33. Cox K, North M, Burke M, et al. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. *J Leukoc Biol* 2005;78:1142-52.

34. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol* 2012;92:753-64.



35. IL10 interleukin 10 [*Homo sapiens*]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2012. (Accessed 16.01.2012, 2012,
36. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:133-46.
37. Dreschler K, Bratke K, Petermann S, et al. Altered Phenotype of Blood Dendritic Cells in Patients with Acute Pneumonia. *Respiration: Basel.*; 2011.
38. Castro SM, Chakraborty K, Guerrero-Plata A. Cigarette smoke suppresses TLR-7 stimulation in response to virus infection in plasmacytoid dendritic cells. *Toxicol In Vitro* 2011;25:1106-13.
39. Andreas S, Hering T, Mühlig S, Nowak D, Raupach T, Worth H. Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease: an effective medical intervention. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:276-82.
40. Vassallo R, Ryu JH. Smoking-related interstitial lung diseases. *Clin Chest Med* 2012;33:165-78.
41. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442.
42. Buist AS, Vollmer WM, McBurnie MA. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:703-8.
43. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007;370:741-50.
44. To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* 2012;12:204.
45. Goodwin RD. Environmental tobacco smoke and the epidemic of asthma in children: the role of cigarette use. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:447-54.
46. Burchfiel CM, Higgins MW, Keller JB, Howatt WF, Butler WJ, Higgins IT. Passive smoking in childhood. Respiratory conditions and pulmonary function in Tecumseh, Michigan. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:966-73.
47. Rogot E, Murray JL. Smoking and causes of death among U.S. veterans: 16 years of observation. *Public Health Rep* 1980;95:213-22.

48. Alcaide J, Altet MN, Plans P, et al. Cigarette smoking as a risk factor for tuberculosis in young adults: a case-control study. *Tuber Lung Dis* 1996;77:112-6.
49. Arcavi L, Benowitz NL. Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med* 2004;164:2206-16.
50. Kark JD, Lebiush M, Rannon L. Cigarette smoking as a risk factor for epidemic a(h1n1) influenza in young men. *N Engl J Med* 1982;307:1042-6.
51. Tashkin DP, Celli B, Senn S, et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:1543-54.
52. Dransfield MT, Bourbeau J, Jones PW, et al. Once-daily inhaled fluticasone furoate and vilanterol versus vilanterol only for prevention of exacerbations of COPD: two replicate double-blind, parallel-group, randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2013;1:210-23.
53. Suissa S, Patenaude V, Lapi F, Ernst P. Inhaled corticosteroids in COPD and the risk of serious pneumonia. *Thorax* 2013;68:1029-36.
54. Suissa S, Barnes PJ. Inhaled corticosteroids in COPD: the case against. *Eur Respir J* 2009;34:13-6.
55. Crim C, Dransfield MT, Bourbeau J, et al. Pneumonia risk with inhaled fluticasone furoate and vilanterol compared with vilanterol alone in patients with COPD. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12:27-34.
56. Ernst P, Gonzalez AV, Brassard P, Suissa S. Inhaled corticosteroid use in chronic obstructive pulmonary disease and the risk of hospitalization for pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:162-6.
57. Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Brandsma CA, Timens W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *Eur Respir J* 2009;34:219-30.
58. Barnes PJ. Inhaled corticosteroids in COPD: a controversy. *Respiration* 2010;80:89-95.
59. Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, et al. Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* 2007;30:878-86.
60. Vogelmeier C, Buhl R, Criée CP, et al. [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche

Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* 2007;61:e1-40.

61. Busse WW, Wanner A, Adams K, et al. Investigative bronchoprovocation and bronchoscopy in airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:807-16.

62. Kuepper M, Koester K, Bratke K, et al. Increase in Ksp37-positive peripheral blood lymphocytes in mild extrinsic asthma. *Clin Exp Immunol* 2004;137:359-65.

63. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011;29:163-83.

64. Bratke K, Klug A, Julius P, et al. Granzyme K: a novel mediator in acute airway inflammation. *Thorax* 2008;63:1006-11.

65. Wenzel S, Holgate ST. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1173-6; discussion 6-8.

66. Lommatzsch M, Julius P, Virchow JC. Mice running late: T-cell kinetics in models of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:522b-3.

67. Sakiani S, Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and humoral immunity. *Nat Rev Endocrinol* 2012;9:56-62.

68. Donnelly LE, Tudhope SJ, Fenwick PS, Barnes PJ. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. *Eur Respir J* 2010;36:178-86.

69. Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Johnson M, Nijkamp FP, Folkerts G. Combination of fluticasone propionate and salmeterol potentiates the suppression of cigarette smoke-induced IL-8 production by macrophages. *Eur J Pharmacol* 2007;571:55-61.

70. Chung KF, Caramori G, Adcock IM. Inhaled corticosteroids as combination therapy with beta-adrenergic agonists in airways disease: present and future. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:853-71.

71. Barnes NC, Qiu YS, Pavord ID, et al. Antiinflammatory effects of salmeterol/fluticasone propionate in chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:736-43.

72. Hickey MJ, Kubes P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol* 2009;9:364-75.

73. Abe M, Thomson AW. Dexamethasone preferentially suppresses plasmacytoid dendritic cell differentiation and enhances their apoptotic death. *Clin Immunol* 2006;118:300-6.
74. Boor PP, Metselaar HJ, Mancham S, Tilanus HW, Kusters JG, Kwekkeboom J. Prednisolone suppresses the function and promotes apoptosis of plasmacytoid dendritic cells. *Am J Transplant* 2006;6:2332-41.
75. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007;356:775-89.
76. Tashkin DP. Impact of tiotropium on the course of moderate-to-very severe chronic obstructive pulmonary disease: the UPLIFT trial. *Expert Rev Respir Med* 2010;4:279-89.
77. Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, et al. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2011;364:1093-103.
78. Decramer ML, Chapman KR, Dahl R, et al. Once-daily indacaterol versus tiotropium for patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (INVIGORATE): a randomised, blinded, parallel-group study. *Lancet Respir Med* 2013;1:524-33.
79. Wedzicha JA, Decramer M, Ficker JH, et al. Analysis of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations with the dual bronchodilator QVA149 compared with glycopyrronium and tiotropium (SPARK): a randomised, double-blind, parallel-group study. *Lancet Respir Med* 2013;1:199-209.
80. Singanayagam A, Chalmers JD, Hill AT. Inhaled corticosteroids and risk of pneumonia: evidence for and against the proposed association. *QJM* 2010;103:379-85.
81. Singh S, Loke YK. Risk of pneumonia associated with long-term use of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a critical review and update. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:118-22.
82. Magnussen H, Disse B, Rodriguez-Roisin R, et al. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2014;371:1285-94.
83. Ernst P, Saad N, Suissa S. Inhaled corticosteroids in COPD: the clinical evidence. *Eur Respir J* 2015;45:525-37.

84. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2015; 3(6):435-42.

85. Lommatzsch M, Kraeft U, Troebs L, et al. Fluticasone impact on airway dendritic cells in smokers: a randomized controlled trial. *Respir Res* 2013;14:114.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Abt.</b>	Abteilung
<b>AMG</b>	Arzneimittelgesetz
<b>APC</b>	Antigen-präsentierende Zelle
<b>BAL</b>	bronchoalveoläre Lavage
<b>BALF</b>	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
<b>BDCA</b>	Blood Dendritic Cell Antigen
<b>BfArM</b>	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
<b>CCR</b>	CC-Chemokin – Rezeptor
<b>CD</b>	Cluster of differentiation, Differenzierungscluster
<b>chron.</b>	chronisch
<b>COPD</b>	chronic obstructive pulmonary disease
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>Cy5</b>	Cytochrom 5
<b>CXCR</b>	Zytokinrezeptor
<b>CCXR</b>	Zytokinrezeptor
<b>DC</b>	Dendritic cell/dendritische Zelle
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorting
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiozyanat
<b>FEV<sub>1</sub></b>	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
<b>FEV<sub>1</sub>%FVC</b>	bei forcierter Expiration gemessenen Vitalkapazität
<b>FITC</b>	Fluorescein IsoThioCyanate
<b>Flutide®</b>	250 µg Fluticasonpropionat
<b>FSC</b>	forward scatter, Vorwärtsstreuung
<b>FVC</b>	Forcierte Vitalkapazität
<b>G</b>	Erdanziehungskraft
<b>g</b>	Gram
<b>GOLD</b>	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<b>GCP-V</b>	Good Clinical Practice/ Guten Klinischen Praxis-Verordnung
<b>HLA-DR</b>	humanes Leukozytenantigen-DR

<b>ICS</b>	inhalatives Corticosteroid
<b>IgE</b>	Immunoglobulin E
<b>IFN-1</b>	Interferon-1
<b>IL-10</b>	Interleukin-10
<b>IL-4</b>	Interleukin-4
<b>ITGV</b>	Intrathorakales Gasvolumen
<b>LABA</b>	long-acting beta-adrenergic/ langwirksames Beta-2-Mimetikum
<b>LAMA</b>	long-acting muscarinic antagonist/ langwirksames Anticholinergikum
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>Max.</b>	Maximum
<b>mDC</b>	Myeloide dendritische Zelle
<b>Med.</b>	Median
<b>MEF</b>	Maximal Expiratory Flow
<b>MEF 25/50/75</b>	Strömungsgeschwindigkeit der ausgeatmeten Luft bei x% der forcierten Vitalkapazität
<b>MF</b>	Makrophagen
<b>MFI</b>	Median fluorescence Intensity
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>Min.</b>	Minimum
<b>min.</b>	Minute
<b>mL</b>	Mililiter
<b>µL</b>	Mikroliter
<b>mmol</b>	Milimol
<b>MVV</b>	Maximal Voluntary Ventilation, maximal erreichbares Atemzeitvolumen
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>pDC</b>	plasmazytoide dendritische Zelle
<b>PEF</b>	Peak Expiratory Flow, maximale expiratorische Atemstromstärke
<b>PIF</b>	Peak Inspiratory Flow: maximale inspiratorische Atemstromstärke
<b>R<sub>IN</sub></b>	Inspiratorischer Atemwegswiderstand
<b>R<sub>eff</sub></b>	Effektiver Atemwegswiderstand
<b>R<sub>EX</sub></b>	Expiratorischer Atemwegswiderstand
<b>RV</b>	Residualvolumen
<b>RV%TLC</b>	Residual Volume/Total Lung Capacity
<b>SSC</b>	sideward scatter, Seitwärtsstreuung
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Th1</b>	T-Helferzelle vom Typ I
<b>Th2</b>	T-Helferzelle von Typ II
<b>TLC</b>	Totale Lungenkapazität
<b>TLRs</b>	Toll-like receptors

<b>Treg</b>	T-Regulatorzellen
<b>VC</b>	Vitalkapazität
<b>VC IN</b>	Inspiratorische Vitalkapazität
<b>VC EX</b>	Expiratorische Vitalkapazität
<b>Viani®</b>	50 µg Salmeterol (als Salmeterolxinafoat) und 250 µg Fluticasonpropionat
<b>VT</b>	Tidal volume (Atemzugvolumen)

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Das angeborene und erworbene Immunsystem im Überblick. ....	8
Abb. 2 Das erworbene Immunsystem im Detail. ....	8
Abb. 3 Abwehrstrukturen in der Lunge.....	9
Abb. 4 Links (1) ruhende und rechts (2) aktivierte pDC. Entnommen aus <sup>27</sup> ..	12
Abb. 5 Entwicklung von dendritischen Zellen, adaptiert nach <sup>29</sup> . ....	12
Abb. 6 Genehmigung des BfArM, Seite 1. ....	19
Abb. 7 Genehmigung des BfArM, Seite 2. ....	20
Abb. 8 Ablauf der Studie. ....	22
Abb. 9 Studiendesign laut Studienprüfplan (6.5).....	23
Abb. 10 Beispieldiscus mit Studienmedikation zur Inhalation. ....	25
Abb. 11 Bodyplethysmograph der Abteilung für Pneumologie (Universität Rostock).....	28
Abb. 12 Originalbefund der Lungenfunktionsprüfung eines Probanden an den Zeitpunkten A und B. ....	30
Abb. 13 Blutentnahme. Dargestellt sind Serum-, Li-Heparin- und EDTA-Monovetten. ....	33
Abb. 14 Durchführung einer flexiblen Bronchoskopie (OÄ Dr. Bier, Schwester Grit Wentzien und Schwester Gesine Fastnacht). ....	36
Abb. 15 Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer. ....	38
Abb. 16 Das optische System eines Durchflusszytometers. ....	41
Abb. 17 Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Parameter. ....	43
Abb. 18 Der Studienablauf.....	45
Abb. 19 Vergleich der Gesamtleukozytenzahlen in BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) vor und nach Behandlung. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (*)	

- gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe. ....51
- Abb. 20 Vergleich der Differenzierung der Zellen in der BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) zwischen Zeitpunkt A und Zeitpunkt B zwischen den Gruppen. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe. ....52
- Abb. 21 Gesamtleukozyten an den Zeitpunkten A und B im Blut. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe. ....54
- Abb. 22 Anzahl der Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile im Blut an den Zeitpunkten A und B zwischen den Gruppe. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe. ....55
- Abb. 23 Anzahl der pDC in der BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) und Blut in den Gruppen an den Zeitpunkten A und B. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe. ....58
- Abb. 24 Anzahl der pDC in der BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) und Blut in der Placebo-Gruppe und der gemeinsamen Gruppe aller Fluticason behandelten Probanden (F/F+S), an den Zeitpunkten A und B. Signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ist mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe. ....59
- Abb. 25 Daten zur Exacerbationsrate der SPARK Studie <sup>79</sup>, QVA149 = Kombinationstherapie Indacaterol/Glycopyrronium.....66
- Abb. 26 Wahrscheinlichkeit von Exacerbationen unter LAMA/LAMA/ICS-Therapie („ICS continuation“) oder LAMA/LABA-Therapie („ICS withdrawal“) Adaptiert nach <sup>82</sup> .....67



## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Rauch-assoziierte Lungenerkrankungen (Beispiele). ....	14
Tab. 2 Randomisierungsliste der Probanden (Erstellung durch Prof. Kundt, während der Studie war die Zuordnung der Ziffern zu den Präparaten nur Prof. Kundt bekannt). ....	24
Tab. 3 Antikörper für die Durchflusszytometrie. ....	42
Tab. 4 Klinische und anamnestische Daten der Probanden: Median (Min.-Max.). ....	46
Tab. 5 Dauermedikation, Diagnosen und klinische Auffälligkeiten der Probanden. ....	47
Tab. 6 Lungenfunktion zu den Zeitpunkten A und B. ....	48
Tab. 7 Charakteristika der gewonnenen BALF (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit) -Proben. Median (Min.-Max.) Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. ....	50
Tab. 8 Charakteristika der gewonnenen Blutproben. CRP = C-reaktives Protein. ....	53
Tab. 9 pDC in der BALF an den Zeitpunkten A und B. Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. ....	57
Tab. 10 Oberflächenmarker auf pDC. MFI: Median Fluorescence Intensity ..	60

## 6.5 Prüfplan der Studie

Der Prüfplan der Studie (Version 6B 06.05.2009) ist im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock hinterlegt.

## 6.6 Patienteninformationen und Einwilligungen

Alle Einwilligungserklärungen im Original sowie die Patienteninformationsbögen (Version 28.01.2009) sind im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock hinterlegt.

## 6.7 Untersuchungsunterlagen

Alle Unterlagen im Zusammenhang mit den Untersuchungen u.a. die Fragebögen zur Erfassung von Nebenwirkungen und das Protokoll zur

Erfassung der Anzahl der Hübe pro Discus pro Proband sind im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock hinterlegt.

### **6.8 Weitere Daten**

Der vollständige Datensatz ist im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock bei Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch hinterlegt.

### **6.9 Curriculum Vitae**

(Entnommen)

### **6.10 Publikation**

Lommatzsch M, Kraeft U, Troebs L, et al.  
Fluticasone impact on airway dendritic cells  
in smokers: a randomized controlled trial.  
Respir Res 2013;14:114.

Impact-Factor von Respiratory Research 2013: 3,382

## 6.11 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Marek Lommatzsch für die Bereitstellung des Themas, die stetige Hilfe und Unterstützung beim Bearbeiten des Themas sowie die Anregungen und Motivation auf dem Weg der Fertigstellung. Natürlich bedanke ich mich auch bei seiner Frau Mandy Lommatzsch für ihre unermessliche Geduld bei den umfangreichen Arbeiten an dieser Studie, die schon 2007 angefangen haben!

Als nächstes gilt mein Dank OÄ Dr. med. Andrea Bier und nochmals Prof Dr. med. habil. Marek Lommatzsch, dass sie die vielen Bronchoskopien, die für die Studie notwendig waren, durchgeführt haben. Darüberhinaus noch meinen herzlichen Dank für die Assistenz an Jana Brandt, Gesine Fastnacht und Christiane Beil. Außerdem ein großes Dankeschön an Petra Thamm, deren Labor (für Allergologie und Immunologie) schon ein kleines zweites Zuhause wurde, inklusive Pausen-Cappuccino. Sie hat mir tatkräftig bei den immunhistochemischen Messungen und Zellzählungen geholfen. Selbstverständlich geht mein Dank auch an die anderen Mitarbeiter der Forschungsgruppe.

Ein herzliches Dank gilt auch meiner „Doktorarbeitskollegin“ Fr. Laura Lux, geb. Troebs. Wir haben uns gegenseitig unterstützt und abgewechselt in der Betreuung der Probanden und den Auswertungen im Labor. Ohne sie wäre diese aufwendige Studie nicht möglich gewesen.

Ein persönliches Dankeschön gilt auch meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Großvater als Motivatoren. Sie haben mich auf meinem Weg stets begleitend unterstützt. Vielen Dank auch an meinen Mann, der mir Freiräume schuf, die Dissertation fertigzustellen. Meinen Freunden, besonders Dr. Mirko Rehberg und Dr. Tina Blei, gebührt ebenfalls ein aufrichtiges ‚thank you‘ in der Erarbeitung des Themas.

Am Ende möchte ich gerne allen Probanden, die sich bereit erklärt haben an dieser Studie teilzunehmen, danken. Natürlich geht mein Dank auch an Alle, die hier nicht namentlich erwähnt worden sind, aber mitgewirkt haben.

Ulrike Schlüter

## 6.12 Thesen zur Dissertationsschrift

1. Das Immunsystem besteht aus dem angeboren und adaptiven Immunsystem. Wichtige Zellen im angeborenen Immunsystem sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen. Wichtige Zellen des adaptiven Immunsystems sind Antigen-präsentierende dendritische Zellen sowie T- und B-Lymphozyten.
2. Dendritische Zellen können in plasmazytoide und myeloiden dendritische Zellen unterteilt werden. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) fungieren als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem und spielen eine wichtige Rolle in der Infektabwehr.
3. Die COPD ist eine häufige rauchassoziierte Lungenerkrankung. Die Behandlung der COPD mit ICS führt zu einer erhöhten Pneumonierate, die Ursachen dafür sind wenig verstanden.
4. Es fehlen bislang Daten zur Wirkung von ICS auf die pDC in den Atemwegen von Rauchern. Ziel dieser Studie war es daher, erstmals den Einfluss von inhalativen Steroiden mit und ohne langwirksamen Beta-2-Mimetika auf plasmazytoide dendritische Zellen in den humanen Atemwegen bei Rauchern *in vivo* zu charakterisieren.
5. Dazu wurde eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie durchgeführt.
6. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in unseren Untersuchungen in dem Studienarm bei Behandlung mit Fluticason/Salmeterol.
7. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der plasmazytoiden dendritischen Zellen bei Studienarmen mit Fluticason im Vergleich zu Placebo. Durch die 28-tägige Therapie mit Fluticason, Fluticason/Salmeterol oder Placebo konnte keine Änderung der Oberflächenmarker bei den pDC festgestellt werden.
8. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass inhalative Steroide unabhängig von langwirksamen Beta-2-Mimetika die pDC in den Atemwegen von Rauchern reduzieren und somit einen Einfluss auf die Infektabwehr, besonders das Pneumonie-Risiko, haben könnten.
9. Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Mechanismen der pDC-Reduktion und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Patienten mit COPD zu untersuchen.

### **6.13 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel außer den genannten verwendet. Die vorliegende Promotion wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Diese klinische Studie wurde in Kooperation mit Frau Laura Lux (geb. Troebbs) durchgeführt. Frau Lux beschäftigte sich mit dem Einfluss von Fluticason und auf die myeloiden DC, derweil sich meine Promotion mit dem Einfluss von Fluticason auf plasmazytoide DC beschäftigte. Aufgrund des gleichen Studiendesigns und der Ähnlichkeit der Methoden wurde der Methodenteil der Dissertation gemeinsam mit der Ärztin Frau Laura Lux erstellt.

Ulrike Schlüter

Rostock, Juni 2015